

Empfindlichkeitsprüfung
von Staphylococcus aureus - Stämmen
aus Mastitis - Milch gegenüber
Gentamicin, Cefacetril und Bay VP 2674
(Baytril®)

Elke Treitinger



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554808_0097

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Universität München
Lehrstuhl: Prof. Dr. M. Rüsse
Arbeit angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. K. Walser

EMPFINDLICHKEITSPRÜFUNG
VON STAPHYLOCOCCUS AUREUS - STÄMMEN
AUS MASTITIS - MILCH GEGENÜBER
GENTAMICIN, CEFACETRIL UND BAY VP 2674
(Baytril[®])

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig - Maximilians - Universität München

von
Elke Treitinger
aus
München

München 1986

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker
Referent: Prof. Dr. K. Walser
Korreferent: Prof. Dr. G. Terplan

Tag der Promotion: 25. Juli 1986

Denn man soll das Tier nicht am Menschen messen.
In einer Welt, die älter und vollkommener ist
als die unsere, bewegen sie sich vollendet,
begabt mit feinsten Sinnen, die wir verloren
oder nie erreicht haben, geführt von Stimmen,
die wir niemals hören werden

Henry Beston

I n h a l t s a n g a b e

<u>Einleitung</u>	Seite 1
 <u>1. Literatur</u>	 2
1. 1. <u>Der Keim - Staphylococcus aureus</u>	2
1. 1. 1. Geschichte	2
1. 1. 2. Einordnung in die Systematik	3
1. 1. 3. Eigenschaften	6
1. 1. 4. Krankheiten	16
1. 2. <u>Die Chemotherapeutika</u>	20
1. 2. 1. Gentamicin	20
1. 2. 2. Cefacetril	24
1. 2. 3. Bay VP 2674	29
 <u>2. Eigene Untersuchungen</u>	 31
<u>2. 1. Material</u>	31
<u>2. 2. Methoden</u>	31
2. 2. 1. Kulturelle Untersuchungen	31
2. 2. 2. Antibiotogramm	37
2. 2. 3. Reihenverdünnungstest	41
<u>2. 3. Untersuchungsergebnisse</u>	49
2. 3. 1. Mannit - Kochsalz - Phenolrot - Agar	49
2. 3. 2. Koagulase - Test	50

2. 3. 3. Antibiogramm	53
2. 3. 4. Reihenverdünnungstest	55
2. 3. 4. 1. Gentamicin	55
2. 3. 4. 2. Cefacetril	58
2. 3. 4. 3. Bay VP 2674	61

3. Diskussion 64

3. 1. Antibiogramm 65

3. 2. Reihenverdünnungstest 71

3. 2. 1. Gentamicin 71

3. 2. 2. Cefacetril 73

3. 2. 3. Bay VP 2674 76

Zusammenfassung / Summary 77

Literaturverzeichnis 78

Lebenslauf

Einleitung

Durch Staphylokokken verursachte Mastitiden bereiten vermehrt Probleme; zum einen, weil Staphylokokken sehr anpassungsfähig sind, indem sie eine Vielzahl von Enzymen produzieren, zum anderen, da durch den Einsatz von Chemotherapeutika die von Streptokokken verursachten Euterentzündungen zurückgedrängt wurden (41).

Laut T e r p l a n u. Z a a d h o f (1969) sind durchschnittlich 41,4 % der Kühe mit klinisch gesunden Eutervierteln und grobsinnlich unverändertem Milchsekret zumindest auf einem Viertel Ausscheider von Koagulase - positiven Staphylokokken.

Dies läßt verständlich werden, daß es dringend erforderlich ist, laufend die neu auf dem Markt erscheinenden Chemotherapeutika auf ihre Wirksamkeit gegenüber *Staphylococcus aureus* zu überprüfen.

1. Literatur

1. 1. Der Keim - Staphylococcus aureus

1. 1. 1. Geschichte

Vom schottischen Chirurgen O g s t o n , 1882 entdeckt - er stellte in Eiter mikroskopisch kleine, traubenförmige Gebilde fest - und benannt - σταφυλή, griechisch für " Traube " und κόκκος, griechisch für " Beere, Korn "-, hat erst R o s e n b a c h 1884 den Keim das erste Mal richtig beschrieben und auf Grund der unterschiedlichen Pigmentierungen der Kolonien verschiedene Staphylokokkenarten vermutet (12, 68).

1. 1. 2. Einordnung in die Systematik

Nach Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (12) gehört die Klasse "Bacteria" zur 2. Abteilung des Reichs der Procaryotae, zu den chemotrophen Procaryoten. Die Klasse wird nach der äußeren Form der Bakterien unterteilt, hier interessieren nur die Kugelbakterien. Es werden gram - negativ - aerobe, gram - negativ - anaerobe, gram - positiv - anaerobe und gram - positiv - aerob und / oder fakultativ anaerobe unterschieden. Die letztgenannte Gruppe verzweigt sich in die Familien Streptococcaceae und Micrococcaceae.

Die Spezies *Staphylococcus aureus* gehört - nach Bergey's Manual of Determinative Bacteriology - neben *Staphylococcus epidermidis* und *saprophyticus* zum Genus *Staphylococcus*, der zusammen mit *Micrococcus* und *Planococcus* die Familie Micrococcaceae bildet.

Neuere Forschungsergebnisse komplizieren allerdings die Taxonomie des Genus *Staphylococcus*.

Die bisherige Zuordnung des Genus zur Familie Micrococcaceae wird angezweifelt, da sich die Basenzusammensetzung der Nukleinsäuren stark unterscheidet. Die Gehalte an Cytosin und Guanin betragen im Genus *Micrococcus* 66 - 75 Mol%, im Genus *Staphylococcus* nur 30 - 40 Mol% (8, 10):

Auch werden neben *Staphylococcus epidermidis* und *saprophyticus* eine Vielzahl neuer koagulase - negativer Staphylokokkenspezies von der menschlichen Haut (42, 43, 44), aus Lebensmitteln (72) und von verschiedenen Tierarten (15, 73) isoliert.

Staphylococcus aureus selbst läßt sich wegen mehrerer biologischer und lysotypischer Merkmale und hinsichtlich seiner wirtstierspezifischen Tendenz in die Biotypen A bis F einteilen. Biotyp A verursacht hauptsächlich Infektionen bei Menschen, B bei Schweinen und Geflügel, C bei Rindern und Schafen, D bei Hasen, E bei Hunden, Pferden und Nerzen und F bei Füchsen und Tauben. Weil die Biotypen E und F zwar Koagulase aber keinen Clumping Factor produzieren und wegen weiterer Unterschiede in ihrem biochemischen Verhalten und Zellwandaufbau wird vorgeschlagen, sie als neue Spezies " *Staphylococcus intermedius* " einzuordnen (7, 8, 34).

Staphylococcus hyicus - der Erreger des " Ferkel-
ruß " - wird bisher zu Biotyp 2 der vier Biotypen
von *Staphylococcus epidermidis* gerechnet. Einige
Staphylococcus hyicus Kulturen verfügen jedoch
über *Staphylococcus aureus* - Eigenschaften, wie
z. B. Koagulase- und Thernonukleaseproduktion,
so daß die endgültige taxonomische Einstufung
- eventuell als eigene Spezies - weiterer Unter-
suchungen bedarf (7, 8, 14).

Eine vorläufige Klärung der Situation wird der
demnächst erscheinende Band II der 1. Auflage
des *B e r g e y ' s M a n u a l o f S y s t e -*
m a t i c B a c t e r i o l o g y bringen.

1. 1. 3. Eigenschaften

Wie alle aerob und / oder fakultativ anaeroben, gram - positiven Kugelbakterien hat *Staphylococcus aureus* eine annähernd runde Zellform, teilt sich in einer oder mehreren Ebenen, was zu entsprechenden Zellverbänden führt, und hat einen chemoorganotrophen, oxidativ und fermentativ arbeitenden Metabolismus (12, 27, 40, 41, 55, 67, 68).

Alle Micrococcaceae bilden im Gegensatz zu den meisten Streptococcaceae in Sauerstoffmilieu Katalase, ein charakteristisches Merkmal, welches nur bei Mutanten mit fehlerhafter Atmungskette verloren gehen kann (12, 19, 27).

Staphylococcus aureus kommt ubiquitär vor (8, 41, 53, 68), lebt hauptsächlich auf der Haut, in Hautdrüsen und auf der Schleimhaut von Warmblütern (8, 12, 26, 60, 68, 69), kann als obligat parasitär bezeichnet werden (41) und viele seiner Stämme sind potentiell pathogen (12).

Obwohl *Staphylococcus aureus* als vielseitig veränderlich in seinen Kolonieformen, Pigmenten, hämolysierenden und koagulierenden Eigenschaften gilt (67), wird er folgendermaßen charakterisiert:

- In natürlichem Material liegt er in unregelmäßigen Haufen, Diplo- und Tetradenformen vor (27).
- Er ist ca. 0,8 - 1 μm groß (12) und unbeweglich, im Gegensatz zu *Planococcus* (10, 12, 55).
- Seine Kolonien sind 1 - 2 mm groß, glatt, etwas erhaben, glänzend, schmierig, mit einem deutlichen Rand und undurchsichtig, weil in der Regel pigmentiert (12, 67, 68).
Bei Milieuverhältnissen, die das normale Wachstum behindern, kann es zu R- (rauhen), D- (verzweigten) oder L- (osmotisch fragilen) Kolonienformen kommen (8, 12, 19).
- Die Pigmentproduktion ist extrem veränderlich. Es handelt sich um wasserunlösliche Karotinoide, die, abhängig von den Wachstumsbedingungen, zu den Farben weiß, gelb, golden, orange (daher Namen wie " *albus*, *citreus*, *aureus* ") führen oder nach langer künstlicher Züchtung, bzw. unter Luftabschluß ganz ausbleichen (12, 27. 55, 60, 68). Es ist also ein für die Klassifikation völlig ungeeignetes Merkmal (27).
- Die Zellwand von *Staphylococcus aureus* wird hauptsächlich von einem Peptidoglykan, Teichonsäuren und einer speziesspezifischen Antigenstruktur (12, 68), bestehend aus kohlenhydrat-

haltigen Haptenen " Polysacharid A und B " (67), gebildet.

" Protein A " findet sich hauptsächlich an das Peptidoglykan gebunden und in geringer Konzentration im Kulturmedium. Bemerkenswert ist sein Reaktionsvermögen mit den Fc - Stücken von IgG aus humanem Serum (8, 10).

Einige seltene mukoide Staphylokokken bilden zusätzlich eine Kapsel aus Polysachariden, die eng mit der Zelloberfläche verbunden ist und antiphagozytär wirkt (8, 10).

- Das Keimwachstum bleibt unbehindert bei Temperaturen zwischen 6,5 und 46 °C, bei pH - Werten zwischen 4,2 und 9,3, optimal sind Temperaturen von 28 - 37 °C und ein pH von 7,0 - 7,3 (10, 12, 67). *Staphylococcus aureus* ist sehr anspruchslos (10, 40) und wächst je nach Vitalität im Beisein von bis zu 15 % Natriumchlorid oder 40 % Galle (10, 12).
- Im Gegensatz zu Mikro- und Planokokken, die nur unter aeroben Verhältnissen überleben, können Staphylokokken auch anaerob existieren (10, 55, 68, 82). Das membrangebundene Elektronentransportsystem der Atmungskette besteht aus den Cytochromen a, b₁, 0 und Menaquinonen mit Sauerstoff als dem letzten Elektronenakzeptor (12). Es werden viele Kohlenhydrate wie Glucose, Laktose,

Maltose etc. fermentiert und Säuren daraus gebildet (12, 68). Aerob entstehen Essigsäure und Kohlendioxyd, anaerob optisch inaktive oder (L)-Milchsäure (12, 27). Außerdem werden für das aerobe Wachstum bis zu 12 Aminosäuren, Adenin und Thiamin benötigt, in anaerobem Milieu ferner Uracil und eine fermentierbare Kohlenstoffquelle (12). Nicht verwertet werden Stärke und Äskulin (12).

- Staphylococcus aureus produziert eine Vielzahl von Enzymen (12), die helfen, Proteine des Wirtsorganismus verfügbar zu machen (41). Allerdings bilden Stämme tierischen Ursprungs und solche, die gegen bestimmte Antibiotika resistent sind, in der Regel weniger (!) dieser Enzyme (12, 19). Die Herstellung einiger wird erst bei Bedarf induziert (52). Die wichtigsten werden kurz beschrieben:

DNAse (spez. Thermonuklease) gilt als Pathogenitätsmerkmal und ist eng korreliert mit der Koagulasebildung (8, 57).

Penicillinasen spalten 4-gliedrige β -Laktam-Ringe von verschiedenen Antibiotika (21, 52, 82).

Hyaluronidase wird laut S c h w a b a c h e r, C u n c l i f f und W i l l i a m s (1945), von 93,6 % aller Koagulase-positiven Staphylo-

kokken produziert und erleichtert das Eindringen in das Gewebe (8, 19, 37, 55).

Koagulase: Eigentlich handelt es sich um mehrere verschiedene und substratspezifische Koagulasen (12). Es sind Gerinnungsfermente, die zur Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin in Gegenwart eines Plasmafaktors (coagulase reacting factor) führen und auf diese Weise Blutplasma zur Gerinnung bringen (8, 68). Das heute weltweit als Kennzeichen für die Pathogenität anerkannte Merkmal ersetzt eine früher nötige Vielzahl von anderen Untersuchungen (12, 19, 82).

Deutlich abzugrenzen von der Koagulase ist der sogenannte " Clumping Factor " (12, 82), der nicht wie diese frei an das Medium abgegeben zur Reaktion führt (57, 68), sondern ein oberflächlich lokalisiertes, basisches Protein ist, welches durch direkte Reaktion mit Fibrinogen, Fibrinogenspaltprodukten und Fibrinmonomeren (8, 10, 11) das Verklumpen der Keime auslöst.

- Außerdem produziert *Staphylococcus aureus*:

Hämolysine: Es sind Exotoxine mit Eiweißcharakter, das bedeutet, sie haben antigene Eigen-

schaften und können neutralisiert und präzipitiert werden (12, 29, 68). Man unterscheidet sie auch auf Grund ihrer Hämolyseeigenschaften an Erythrozyten verschiedener Tierarten (12, 29, 57, 82). Um im Blut vorhandene Antihämolytine auszuschalten, muß man mit gewaschenen Erythrozyten oder dem Blut von jungen Tieren arbeiten (1, 8, 27).

α -Hämolysin: Es zerstört Kaninchenblut (große Lysis, unscharfer Rand), Rinderblut (schmale Lysis, scharfer Rand), Schaf- und Ziegenblut (19, 27, 66, 68, 82). Mit Menschenblut ergibt sich keine, bzw. nur eine schmale Lysiszone (82). Es handelt sich um ein tödliches, hämolysierendes, dermonekrotisches und neurotoxisches Hämolysin (α - Toxin), welches auch Leukozyten und Blutplättchen zerstört (8, 10, 12, 23).

β -Hämolysin: Laut G e d e k (1972) ist jeder β -Hämolysinbildner als Koagulasepositiv, also pathogen anzusehen. Das β -Hämolysin wird für die intramammäre Entzündungsreaktion verantwortlich gemacht (64) und

besitzt Phospholipase - C - Aktivität gegen Sphingomyeline, wodurch die Erythrozyten - Zellmembran zerstört wird (8, 10, 12). β -Hämolysin ist besonders bei den unter den Tieren verbreiteten Stämmen zu finden (2, 8, 10, 12, 64, 66). Bei Kaninchenerythrozyten erfolgt keine, bei menschlichen eine verschieden starke und verzögerte Hämolysen (82). Außerdem werden Erythrozyten vom Rind (große Zone, verfärbt), Schaf und Ziege angegriffen, aber nicht völlig aufgelöst (19, 27, 68, 82). Für den CAMP-Test in der Streptokokken-Diagnostik wird auf diese inkomplette Form der Hämolysen zurückgegriffen (27, 68).

Das Verbringen mit Staphylococcus aureus bebrüteter Blutplatten in einen Kühlschrank läßt die β -Hämolysenzone aufklaren, deshalb wird dieses Phänomen als " hot-cold-lysis " bezeichnet (8, 19, 68, 70, 82).

γ -Hämolysin: Agar Agar hemmt die Aktivität dieses

zweiteiligen Hämolysins. Es ist hitzeempfindlich und lysiert Erythrozyten von Kaninchen, Menschen und Schafen, nicht jedoch solche von Pferden (8, 10).

♂-Hämolysin: Dieses Hämolysin wirkt nur an von β -Hämolysin vorgeschädigten Zellen (71). Bei Erythrozyten von Mensch, Affe, Meerschweinchen, Pferd, Schaf, Ratte und Maus kommt es zu einer schmalen Lysiszone mit scharfem Rand (8, 19, 27, 68).

⋈-Hämolysin: Nur 50 % Koagulase-negativer Staphylokokken-Stämme bilden überhaupt dieses Hämolysin (1). Es wird nicht von Antihämolysinen gehemmt (27, 71), wird von β -Hämolysin potenziert und verursacht auf Schaf- und Rinderblutagar eine enge Zone völliger Hämolyse (71).

Während beim Menschen α - und ♂-Hämolysin produzierende Stämme vorherrschen, sind es beim Tier α , β , ♂-Stämme (19, 57, 68). A b o - E l n a g a und K a n d l e r (1965) fanden unter 97 Koagulase-positiven Stämmen 76 α , β , ♂-Hämolysin-Bildner, das sind 78,4 %, G e d e k (1972) fand 86,7 % unter Milch-Staphylokokken.

Enterotoxine: Es gibt die Enterotoxine A bis E mit unterschiedlicher Antigenstruktur (12, 33, 57, 68, 82) und großer Hitzestabilität (57, 68). Sie können Kreislaufstörungen, heftiges Erbrechen und Durchfälle 4 - 8 Stunden nach einer Mahlzeit hervorrufen (57, 68, 82); man spricht von Lebensmittelvergiftung (12, 27, 54, 55, 57). Nur ca. 10 % der in Milch gefundenen Koagulase-positiven Staphylokokkenstämme bilden diese Toxine (8, 27, 33, 57, 82).

Das sog. Enterotoxin F ist verantwortlich für das durch Tampons ausgelöste Toxic-Shock-Syndrom bei Frauen (10).

PVL (Panton-Valentine-Leukozidin): Es zerstört menschliche Leukozyten und andere Zellmembranen, indem es die K-Permeabilität steigert (8, 10, 12, 23).

- Um markante regionale Unterschiede (56) und epidemiologische Zusammenhänge aufzuklären (68), macht man sich zunutze, daß Staphylokokken Wirtszellen für eine Vielzahl von Phagen sind (12). Diese Tatsache spielt auch bei der Merkmalsvererbung durch Transduktion (z.B. Resistenzvererbung) eine große Rolle. Zwischen Phage und Wirtszelle besteht eine konstante und spezifische

Beziehung (27, 57, 68). Wenn bestimmte Testphagen angereichert werden und deren Lysespektrum bestimmt ist, kann nach erfolgter Einstellung der Phagenkonzentration die Typisierung des zu untersuchenden *Staphylococcus-aureus*-Stammes vorgenommen werden; nur bestimmte Phagen werden diesen speziellen Stamm angreifen und eine Zellzerstörung bewirken (27). Diese Differenzierung heißt Lysotypie. Das Verhalten gegen Antibiotika und die hervorgerufene Sekretionsstörung im Euter ist bei den einzelnen Lysogruppen unterschiedlich (56). Für den menschlichen Gebrauch gibt es einen gut entwickelten Phagensatz (12), der für bovine Staphylokokken allerdings nur begrenzt geeignet ist (27, 57). Bei Mastitis - Staphylokokken herrscht die Lysogruppe IV vor (27, 56) und diese ist für den veterinärmedizinischen Gebrauch ungenügend unterteilt (27, 54, 57). Es wird daher versucht durch das Hinzufügen weiterer Phagen ein brauchbares Instrument in die Hand zu bekommen (27, 57).

1. 1. 4. Krankheiten

Staphylococcus aureus gilt als Entzündungs- und Eitererreger (68), der im einzelnen zu folgenden Krankheiten führen kann:

- Akne, Furunkulose, Botryomykose (Pferd)
(41, 68)
- Nabelentzündung (69)
- pyogene Allgemeininfektion (69)
- Infektiöse Keratokonjunktivitis (69)
- Enzootische Bronchopneumonie (als Sekundärerreger) (69)
- Lebensmittelvergiftung (57, 68, 77, 82)
- Toxic-Shock-Syndrom (10)
- Mastitiden

Es waren B a n g und L u c e t, die 1889 erstmals im Euter Staphylokokken nachwiesen (27, 69). Heute wird erst von Mastitis gesprochen, wenn ein Anstieg der in der Milch vorhandenen somatischen Zellen und der Phagozytoseleistung festgestellt wird (78). Ein positiver Keimbefund allein ist ungenügend.

Staphylococcus aureus verursacht verschiedene Mastitisformen:

- perakut: Beim Schaf, selten beim Rind, kann es zu gangränösen Verlaufsformen kommen (2, 36, 37, 68).

Das sezernierte α -Toxin stört die Durchblutung durch Arteriolenkonstriktion (2), so daß es zur Thrombenbildung und jauchigen Einschmelzung des betroffenen Viertels kommt (27). Das Sekret ist lackfarben und blutig-wässrig (36).

- akut: Diese Mastitisform kann nach einer Neuinfektion oder durch das Aufflackern einer chronischen Infektion zustande kommen (27, 36, 41). Das Sekret ist anfangs unverändert (54), später flockig, rötlich-wässrig bis eitrig und mehr oder weniger vermindert (36, 41, 54, 58, 77). Die Milchdrüse ist geschwollen, ödematös, hart, schmerzhaft (36, 41, 58) und es kommt zu Anorexie, Fieber und u.U. Festliegen (2, 11, 41).
- subakut, subklinisch, chronisch (16, 27, 36, 41, 68, 82): Charakterisiert durch keine oder nur sehr wenige klinische Anzeichen, wie Flocken und Klümpchen in den ersten Milchstrahlen (2, 11, 41), kommt es zum schleichenden Umbau und zur Zerstörung der Alveoli und der Milchgänge - Galactophoritis, Galactophoromastitis (69) -, die endlich durch Narbengewebe ersetzt werden (36, 41, 58), was eine Abnahme der Milchleistung zur Folge hat (36, 41). Die Zahl der somatischen Zellen in der Milch ist in der Regel über 500.000/ml erhöht (27, 41) und so kann die subklinische

Form durch ein positives Ergebnis beim CMT
(SMT) entdeckt werden (36, 41, 68).

Unsachgemäßes Melken, Verletzungen, Haltungsfehler (27) und mangelnde Hygiene (36, 68) führen zur galaktogenen Infektion (69), obwohl die Vermehrung des Keimes durch humorale Komponenten in der Milch gehemmt wird (27). Besonders betroffen sind Euter mit ungünstigen anatomischen Verhältnissen, z.B. groß, lose aufgehängt und bodennah; so ist die Wahrscheinlichkeit von Staphylokokken-Infektionen in den hinteren Vierteln um 50 % höher als vorn (35). Der prozentuale Anteil infizierter Tiere steigt mit dem Alter (2), auch α - und β -Antitoxine werden im Blut älterer Kühe öfters nachgewiesen (27). *Staphylococcus aureus* dringt aktiv in das Eutergewebe ein (9, 58), was ihn für Chemotherapeutika schlecht erreichbar werden läßt. Das produzierte α -Toxin allein genügt, um eine Mastitis auszulösen (27), indem Leukozyten-Lysosomen freigesetzt werden und sich so die Entzündungsreaktion vervielfältigt (71). In der Regel handelt es sich bei Staphylokokken-Mastitiden um hartnäckige Fälle, die therapeutisch nur zur Hälfte erfolgreich behandelt werden können und zu Herdenproblemen werden (68, 82). Nachdem auch

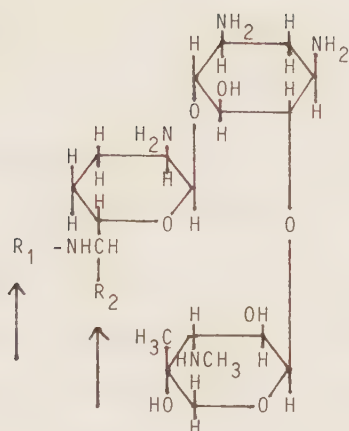
Toxoidimpfstoffe in Immunisierungsversuchen unbefriedigende Ergebnisse brachten (2, 27, 41, 64, 68), bleibt nach gezielter chemotherapeutischer Behandlung des trockenstehenden Tieres nur noch die Ausmerzung therapieresistenter Fälle, um bleibende Ansteckungsquellen zu eliminieren.

1. 2. Die Chemotherapeutika

1. 2. 1. Gentamicin

Es wurde 1963 von W e i n s t e i n und Mitarbeitern untersucht und beschrieben, dann im folgenden Jahr von R o s s e l e t und Mitarbeitern gereinigt hergestellt und genau charakterisiert (23, 32).

Es gehört zu den Aminoglycosidantibiotika (23, 32), die wirksam werden, indem sie an ribosomale 30-S-Untereinheiten gebunden werden und die Proteinsynthese hemmen (23) bzw. Nonsense-Proteine verursachen (22, 79). Voraussetzung für eine uneingeschränkte Aktivität dieser Antibiotika ist also eine vorhandene Syntheseleistung der Keime (23). Gentamicin ist das größte der Aminoglycosidantibiotika (52) und wird von zwei Micromonospora-Arten (*M. purpurea* sp. n. und *M. echinospora* sp. n.; NRRL 2953 bzw. 2985) hergestellt (32, 75). Es besteht aus einem Gemisch basischer Oligosaccharide (23, 84), mit der Summenformel (84) $C_{17-18}H_{34-36}N_4O_7$ und mit folgender Strukturformel (32):



Die Reste R₁ und R₂ stehen für

CH ₃	CH ₃	bei Gentamicin C ₁
CH ₃	H	C ₂
H	H	C _{1A}

Die Gentamicine C₁ und C_{1A} sind zu 70 %, das C₂ zu 30 % am Gesamtprodukt, das als Sulfat im Handel ist, beteiligt (32, 79, 84). Das Molekulargewicht von Gentamicin beträgt 425 ± 21 und es ist wasserlöslich (84).

Es greift ein breites Spektrum von Bakterien an, besonders gram-negative (22, 23, 32, 79, 84), wirkt bakterizid (32, 84). Das Wirkungsoptimum liegt bei einem pH von 7,8 (32, 84). Bisher

sind nur wenig resistente Keime, z.B. *Mycobacterium tuberculosis*, bekannt (23). In vitro wurden Kreuzresistenzen mit Kana-, Neo-, Paromo- und Streptomycin entdeckt (84). Entweder können die bakteriellen Ribosomen das Gentamicin nicht mehr binden, oder der Transport zum Wirkungsort wird verhindert, oder die Keime produzieren plötzlich Enzyme, die das Chemotherapeutikum metabolisieren (32). Kombiniert mit Calciumchlorid, Natriumchlorid, Calciumnitrat und Heparin kommt es zu einer erheblich reduzierten (32, 84), mit Ampicillin zu einer synergistischen Wirkung (84).

Durch den polaren Charakter (32) wird Gentamicin nur minimal aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert (84), die Diffusion in die verschiedenen Körperflüssigkeiten ist beeinträchtigt - besonders bei fehlenden Entzündungsreaktionen - (32), und die Konzentration im Gewebe bleibt bei Einhaltung der empfohlenen Dosis niedrig, so daß die Resultate zum Teil unbefriedigend sind (84). Bei intramuskulären Injektionen kommt es rasch (nach ca. 1 Stunde) zu Serummaximalwerten (32) und bei einer Halbwertszeit von 1 - 2 Stunden (32, 84) hält eine wirksame Konzentration ca. 6 - 8 Stunden an (32). Nur 30 % des Wirkstoffes ist plasma-proteingebunden (32, 84). Gentamicin wird über

den Urin in aktiver Form eliminiert; nach der glomerulären Filtration findet keine bzw. nur eine sehr geringe tubuläre Rückresorbtion statt, so daß die Urinkonzentration das 50 - 100 fache der Plasmakonzentration erreichen kann (32, 84). Nebenwirkungen treten auf in Form von: Schwindelgefühl, Erbrechen, Kopfschmerzen und vorübergehender Proteinurie (32), Erhöhung des Reststickstoffgehalts im Blut (32, 52, 84), - deshalb kontraindiziert bei Nierenfunktionsstörungen (79, 84) -, Erhöhung der Serumtransaminasen und alkalischen Phosphatasen (32), vorübergehender Hautläsionen (32), Allergien (23), und selektiver Neurotoxizität gegen den 8. Hirnnerv - N. vestibulocochlearis - (22, 23, 32, 52, 79, 84).

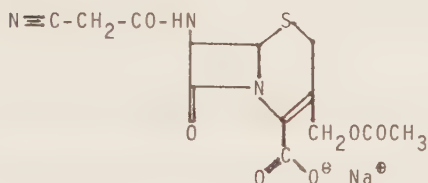
1. 2. 2. Cefacetril

B r o t z u hat 1945 aus verschiedenen Schimmelpilzen (Cephalosporiumarten sind verwandt mit Penicilliumarten) Cephalosporine isoliert (52, 79). Weil sie nur wenig Wirksamkeit zeigten, wurde ihnen lange keine therapeutische Bedeutung beigemessen (23). Heute werden 4 Gruppen von Cephalosporinen auf Grund von Beziehungen zwischen Wirkstoffstruktur, Stabilität gegen Metabolisierung und antibiotischer Aktivität unterschieden (30, 47). Mit Cephalothin und Cefapirin gehört Cefacetril zur 1. Gruppe (30, 47). Seit 1979 ist es für intramammären Gebrauch zugelassen (89) und als Natriumsalz im Handel (75).

Die Wirkung beruht auf einer Interferenz mit der Synthese von Zellwandbestandteilen (48, 50, 52, 79, 83, 88), die Quervernetzung der Makromoleküle wird behindert (50) und es kommt zur Plasmolyse (79). Voraussetzung ist eine proliferierende Keimpopulation (79).

Die Grundstruktur des Cefacetril, die 7-Amino-Cephalosporansäure, ein β -Laktamring (23, 30, 50, 75, 79), wird bei der semisynthetischen Herstellung von Cephalosporium acremonium (79, 83) produziert. Um eine höhere Ausbeute zu sichern kann auch eine Penicilliumart verwendet werden, wenn anschließend

die synthetisierte Penicillingrundlage umgewandelt wird (79). Der chemische Name 3-(Acetoxymethyl)-7-(2-cyano-acetamido)-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo-[4.2.0]oct-2-en-2-carboxylsäure steht für folgende Strukturformel (48, 83, 88):



Es handelt sich um eine schwache Säure -pK 2,42-, die gut in Wasser (bis 50%), aber schlecht in organischen Lösungsmitteln löslich ist (75, 83, 88). Am stabilsten ist die Substanz bei niedrigen Temperaturen und pH 3,5 (83).

Cefacetril wirkt bakterizid (18, 30, 50, 83) gegen ein breites Keimspektrum (30, 75, 76, 83) und kann daher als Monopräparat verwendet werden (75, 83). Trotz des β -Laktam-Ringes ist Cefacetril durch die von *Staphylococcus aureus* produzierte Penicillinase (β -Laktamase I) nicht gefährdet (23, 76, 79); seine Stabilität dagegen entspricht der des Methicillins (48, 50, 75). Nur von der sogenannten Cephalosporinase (β -Laktamase II) kann es zerstört werden (52, 79).

Cefacetril ist somit gegen Penicillin-sensible und - resistente Staphylokokken-Stämme gleichermaßen wirksam (47, 75, 88) und wird besser eingestuft als Penicillin - Streptomycin - Kombinationen in üblicher Dosierung (75). Selten treten Kreuz-resistenzen mit Penicillin auf. Es kann bei Penicillinallergien durchaus zum Einsatz kommen (48, 50, 79).

Dem Chemotherapeutikum werden ungewöhnlich hohe Fähigkeiten der Gewebepenetration zugesichert, eine Eigenschaft, die für den therapeutischen Erfolg entscheidend ist (75). Die Verteilung im Eutergewebe und den verschiedenen Körperflüssigkeiten ist gut bis sehr gut (75). Allerdings geht Cefacetril vom Blut nur begrenzt in die Milch über, solange keine Entzündung vorliegt (88). Oral gegeben erfolgt nur eine geringe Resorption (88). 33,36 % des Wirkstoffes sind an Serumproteine gebunden (75, 83, 88). Die Ausscheidung erfolgt schnell und in biologisch aktiver Form über die Nieren (17, 52, 75, 88), bei einer Halbwertszeit von ca. 1 Stunde (17, 75).

Intramammär eingebracht hängt die Ausscheidung von der Arzneimittelformulierung ab; wird es schnell freigesetzt, kann nach 72 Stunden, langsam nach 120 Stunden kein Wirkstoff in der Milch mehr

nachgewiesen werden (13, 75). Es gibt keine bzw. nur geringe Unterschiede im Konzentrationsverlauf bei zeitlich im Verhältnis zur Melkzeit veränderter Applikation und trotz mehrmaligen Ausmelkens (76, 83).

Cefacetril hat nur wenig Nebenwirkungen (18, 50, 75). Im Liquor kann es zu neurotoxischen Erscheinungen kommen (23), aber im Gegensatz zu verwandten Derivaten hat es selbst bei gestörter Nierenfunktion nur wenig nephrotoxische Eigenschaften (23, 75, 83). Cefacetril ist weder mutagen noch teratogen, führt aber in hohen Dosen zu verzögerter fetaler Entwicklung bei Nagern (83).

Folgende Zahlen sollen zeigen, warum Cefacetril für die Mastitistherapie so interessant ist:

- Von 200 mit Staphylococcus aureus intramammär infizierten Kühen genesen laut S c h l u e p (1979) 77 %.
- Von 25 Staphylococcus aureus - Mastitiden heilen K l o s s o w s k a und W i s - n i o w s k i (1981) 71 %.
- Von 36 Staphylococcus aureus - Mastitiden, die alle in vitro Cefacetril-sensibel sind, gesunden laut M e s s e r l i (1982) 53 %.

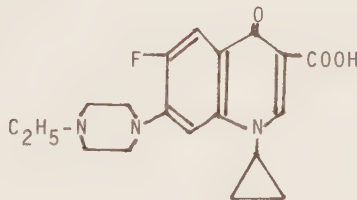
- Die Vetimast^R Produkt- und Gebrauchsinformation (1983) gibt an, daß von 180 Staphylokokken-Mastitiden 69 % geheilt werden.

1. 2. 3. Bay VP 2674

Es handelt sich um ein neuentwickeltes, noch nicht auf dem Markt erhältliches Chinoloncarbonsäurederivat (5).

Die Wirkung von Bay VP 2674 beruht vermutlich auf einer Hemmung der DNA - Gyrase (5).

Der chemische Name 1-Cyclopropyl-7-(4-ethyl-1-piperazinyl)-6-fluor-1,4-dihydro-4-oxo-3-chinolincarbonsäure und die Summenformel $C_{19}H_{22}FN_3O_3$ stehen für folgende Struktur:



Das Molekulargewicht beträgt 359,4. In der klinischen Prüfung wird es als Betain, bei in vitro-Untersuchungen als Hydrochlorid verwendet. Es ist wasserlöslich, thermostabil und schwach lichtempfindlich (5).

Als Breitspektrumantibiotikum wirkt es besonders gut gegen gram - negative, gut gegen gram - positive Keime, vor allem aber auch gegen Mycoplasmen. Als eindeutiger Vorteil kann seine Wirksamkeit

gegen Bakterien bezeichnet werden, die resistent gegen β -Laktam- und Aminoglycosidantibiotika sind. Oral und parenteral wird es gut resorbiert, Serum-maximalwerte werden nach ca. 2 Stunden erreicht. Ausgeschieden wird Bay VP 2674 zu drei Viertel mit den Faeces, davon zwei Drittel unverändert, und zu einem Viertel über den Harn, zu 60 % unverändert (5).

Das Chemotherapeutikum gilt als gut verträglich, bisher liegen allerdings noch keine Werte über intramammäre Applikation vor (5).

2. Eigene Untersuchungen

2. 1. Material

Die 225 untersuchten Staphylokokken - Isolate stammen aus Viertelgemelksproben euterkranker Kühe aus dem oberbayerischen Raum. Die Milch wurde nach der Methode von D i e r n h o f e r entnommen und im Kühlschrank maximal eine Woche bis zur Weiterverarbeitung aufgehoben.

2. 2. Methoden

2. 2. 1. Kulturelle Untersuchungen

Da die mikroskopische Bestimmung (abgesehen von der Fluoreszenzmikroskopie) zu ungenau ist (27), wurden die Keime nach ihrem Wachstumsverhalten auf Agarnährböden vorselektiert.

Die Milchproben wurden - im Rahmen der am Institut üblichen Routineuntersuchung - zuerst auf Blutagar- und Edwardsplatten ausgestrichen.

Zur Herstellung der Blutplatten wurde Tryptose Blood Agar Base verwendet (Difco Laboratories 0232-01-9). 66g Tryptose Blood Agar Base und 2 g Esculin wurden mit 2 l Aqua dest. aufgekocht bis die Lösung klar war und anschließend autoklaviert. Vor dem Gießen der Platten wurden ca. 7 % gewaschene Rindererythrozyten zugesetzt.

Edwardsplatten wurden genauso hergestellt, nur mußten vor dem Aufkochen 66,6 ml 1 % Thallium-sulfat- und 2,6 ml 0,1 % Kristallviolett-lösung untergemischt werden. Nach 24 Stunden aeroben Bebrütens im Brutschrank bei ca. 37 °C wurden Einzelkolonien auf ihre Morphologie und ihre hämolyysierenden Eigenschaften untersucht. Auf Edwards Medium mußten die für Staphylokokken typischen Kulturen fehlen.

Solchermaßen identifiziertes Material wurde mit einer Öse auf Mannit-Kochsalz-Phenolrot-Agar (modifiziert nach C h a p m a n 1945) aufgetragen, weil er ein Selektivnährboden für pathogene Staphylokokken ist und um die Stämme zu isolieren (18, 45, 59, 61, 71, 80).

Mannit-Kochsalz-Phenolrot-Agar (Merck Art. No. 5404) besteht aus:

10,0 g/l Pepton aus Fleisch
1,0 g/l Fleischextrakt
75,0 g/l Natriumchlorid
10,0 g/l D(-)Mannit
0,025 g/l Phenolrot
12,0 g/l Agar Agar (59).

108 g des Pulvers werden in 1 l Aqua dest. gelöst und wie oben beschrieben ohne Blutzusatz zubereitet.

Das Prinzip beruht auf der Toleranz von Staphylokokken gegenüber Kochsalz (12, 40, 55, 59, 60, 67, 71) und der Mannitvergärung, die nur pathogenen Staphylokokken, also *Staphylococcus aureus*, möglich ist. Wegen der Säureproduktion bei diesem Vorgang schlägt der Indikator Phenolrot nach Gelb um (40, 59, 70, 71).

Nach 24 Stunden aerober Bebrütung bei 37°C wurden die Platten abgelesen.

Da dieses Verfahren nicht, wie C h a p m a n vermutete, sicher zur Differenzierung von pathogenen und apathogenen Stämmen geeignet ist, mußte es mit der Untersuchung auf Koagulaseproduktion gekoppelt werden (38, 57, 68, 69, 70, 78). Interessehalber wurden auch die wenigen Mannit-negativen Stämme mituntersucht.

Schon 1926 hat D a r â n y behauptet, daß koagulase - positive Stämme pathogen sind (27). Selten gibt es koagulase - negative *Staphylococcus-aureus*-Formen, die aber als pathogen durch ihre Thermo-

nukleaseproduktion zu erkennen sind (12, 82).

Für animale Staphylokokken-Stämme kann Plasma von Kaninchen (optimal), Pferd, Esel, Rind, Schaf, Ziege, Schwein und Gans für den Test verwendet werden (2, 12, 19, 27, 62, 68, 82).

Beim Koagulase-Test muß berücksichtigt werden, daß Plasma ein sehr variables Material ist. Fehlschläge können auf 3 Fehlergruppen zurückzuführen sein:

- Zum Testzeitpunkt kann die vorhandene Koagulase-menge unzureichend sein, wegen ungenügenden Umweltbedingungen für die Kultur, wegen verschiedenen starker Koagulaseproduktion, oder wegen Zerstörung der Koagulase durch den Keim selbst oder durch im Plasma enthaltene Stoffe (19).
- Das Plasma kann ungeeignet sein, wegen Fehlen des Plasmafaktors (unnötig für den Clumping Factor Test (11), wegen unspezifischer Hemmstoffe im Plasma und wegen vorhandener Antikörper gegen die Koagulase (19).
- Das Fibrin kann schon vor dem Ablesen durch Fibrinolysin, Proteasen etc. zerstört werden (19).

Hier wurde wegen der leichten Verfügbarkeit mit Rinderplasma gearbeitet. Zur Gerinnungshemmung wurden 1,2 g Ammoniumoxalat und 0,8 g Kaliumoxalat mit 100 ml Aqua dest. autoklaviert. 1 ml der Lösung reicht für 10 ml Blut, also wurde eine entsprechende Menge in einer Flasche sterilisiert. Dabei trocknet die Flüssigkeit ein. Es wurde mit Oxalat gearbeitet, weil Citrat-Plasma durch Citrat verarbeitende Bakterien zu falschem Verklumpen führen kann (12, 19).

Das von gesunden Klinik-Kühen gewonnene Blut wurde in der vorbereiteten Flasche aufgefangen und anschließend sofort schonend bei ca. 4100 U/min und 14°C für 10 Minuten zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde steril entnommen und portionsweise eingefroren. Es ist so ca. 1 Jahr haltbar (19).

Im Röhrchentest, der auch beim negativen Ausfall des Objektträgertests durchgeführt werden soll (57, 68), wird eine Öse des Keimmaterials in 1 ml Plasma und 5 ml physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und bei 37°C bebrütet. Nach 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24 Stunden wird geprüft, ob eine Gerinnung stattgefunden hat (55, 57).

Der Objektträgertest prüft eigentlich das Vorhandensein des Clumping Factors, da aber 96,8 % der Clumping Factor - positiven Keime auch koagulase-positiv sind (51), bzw. die Unterschiede im Ergebnis zwischen den beiden Methoden mit 1,36 und 4,95 % angegeben werden (63), hat sich diese Methode der Einfachheit halber bei meinen Untersuchungen angeboten. Eine Öse voll Keimmaterial wurde in 2 - 3 Tropfen Plasma auf einer Glasplatte mit dunklem Hintergrund verrieben. Bei vorhandenem Clumping Factor verklumpen die Keime, bei fehlendem Clumping Factor kommt es zur milchigen Trübung des Plasmas (57, 63, 68, 82). Durch Kontrolle mit physiologischer Kochsalzlösung wurde eine Spontanagglutination ausgeschlossen.

2. 2. 2. Antibiotogramm

Der Agardiffusionstest dient der Resistenzbestimmung eines Keimes gegenüber mehreren Chemotherapeutika gleichzeitig. Früher auch zur Typenbestimmung eingesetzt, ist er heute in der Routinediagnostik üblich und ausreichend und wurde hier zur Gewinnung eines Überblickes gebraucht. Dabei wurde Antibiotika - Sulfonamid - Sensibilitäts - Agar (ASS, Merck No. 5392) verwendet. Er besteht aus:

10,0 g/l Proteose - Pepton

10,0 g/l Fleischextrakt

2,0 g/l D (+) Glucose

3,0 g/l Natriumchlorid

2,0 g/l di - Natrium - hydrogensulfat

1,0 g/l Natriumacetat

je 0,01g/l Adenin, Guanin, Uracil und Xanthin

12,0 g/l Agar Agar.

40 g dieses Pulvers wurden mit 1 l Aqua dest. gekocht bis die Lösung klar war, autoklaviert und anschließend zu Platten gegossen.

Die Keime wurden mittels Öse von den Mannit - Kochsalz - Phenolrot - Nährböden in eine sterile Nährbouillon verbracht (Standard I Nährbouillon Merck No. 7882), bestehend aus:

7,8 g/l Pepton aus Fleisch

7,8 g/l Pepton aus Casein

2,8 g/l Hefeextrakt

5,6 g/l Natriumchlorid

1,0 g/l D(+)Glucose.

Durch vorsichtiges Rühren entstand eine Suspension. Ein Teil davon wurde mit einem sterilen Wattebausch entnommen und auf jeweils zwei ASS-Platten ausgestrichen. Danach wurde je ein wirkstoffgetränkter Filterpapierring (BBL - Sensi Disc, Mast - Diagnostica, Hamburg, TRG 8 Vet 1, TRG 9 Vet 2) mit einer zwischendurch immer wieder abgeflamten Pinzette auf die Nährböden gelegt und festgestippt.

Der Vet 1 Ring trägt peripher angeordnet folgende Chemotherapeutika:

Ampicillin	10 µg
Penicillin	6 µg
Gentamicin	10 µg
Erythromycin	15 µg
Tetracyclin	30 µg
Nitrofurantoin	100 µg
Chloramphenicol	30 µg
Cotrimoxazol	25 µg

Der Vet 2 Ring:

Polymyxin B	30 µg
Oxacillin	5 µg
Streptomycin	10 µg
Neomycin	30 µg
Spectinomycin	25 µg
Lincomycin	15 µg
Sulphamethizol	300 µg
Tylosin	30 µg

Zentral wurden extra auf den ersten Nährboden jedes Keimes ein Testblättchen mit Cefacetril (30 µg, BBL^R-Sensi Disc, Ciba Geigy), auf den zweiten Nährboden ein Blättchen mit Bay VP 2674 - HCl (5 µg, Oxoid^R) gelegt.

Die ASS - Platten wurden anschließend bei 37°C für 24 Stunden bebrütet.

Während dieser Zeit diffundiert der Wirkstoff in den Agar und wo es den Keimen möglich ist, bilden sich Kolonien. Die Zone ohne Wachstum um die wirkstoffgetränkten Filterpapierscheibchen wird Hemmhof genannt. Die Hemmhofgröße ist abhängig von der Einsaatdichte der Keime - ideal sind gerade noch einzelstehende Kolonien (68) -, von der Diffusionsgeschwindigkeit der einzelnen Thera-

peutika und von deren Wirkstoffgehalt (6, 68, 85). Sie hängt nicht mit der in-vivo-Aktivität zusammen (68), die zusätzlich von Faktoren wie anatomisch-pathologische Veränderungen, körpereigene Abwehr etc. abhängt (68). So können sich die Aussagen immer nur auf unwirksame Chemotherapeutika beziehen. Zur Auswertung wurden die Hemmhofdurchmesser mit den für die verschiedenen Chemotherapeutika von DIN bzw. NCCLS angegebenen Grenzwerten verglichen. Danach erfolgte die Einteilung in empfindlich, mäßig empfindlich und resistent. F l e m m i n g und K a r l e (1984) empfehlen für Cefacetril Keime mit Hemmhöfen, die größer oder gleich 17 mm sind als empfindlich, solche, die kleiner oder gleich 13 mm sind als resistent, und jene dazwischen als mäßig empfindlich einzustufen. Als sensibel galt auch die partielle Unterbindung der Koloniebildung bei bakteriostatischen Medikamenten.

2. 2. 3. Reihenverdünnungstest

Zu den zuverlässigsten Methoden der Empfindlichkeitsprüfung gehört der Reihenverdünnungstest. Zwar ist er zeit- und materialaufwendig, erlaubt aber exakte und quantitative Aussagen (56). Die Methode besteht darin, zum Grundsubstrat das zu prüfende Chemotherapeutikum in abgestufter Konzentration beizufügen und nach Beimpfung und Bebrütung des Mediums die erste Stufe ohne Wachstum als MHK-Wert (minimale Hemmkonzentration) festzuhalten (20, 52, 55, 68, 88). Erst ein Vergleich mit dem erzielbaren Blutspiegel - nur der freie, nicht der an Plasmaproteine gebundene Anteil ist verfügbar (52) - läßt die eigentliche Eignung eines Medikamentes erkennen (52, 68).

Der Reihenverdünnungstest kann mit flüssigem oder festem Medium durchgeführt werden. Bei dieser Arbeit wurde nach DIN 58940 - Teil 6 (20), August 1979, gearbeitet.

Die Reinsubstanzen, direkt vom Hersteller bezogen, hatten folgende Aktivitäten:

Gentamicin - 597 µg/mg - Serva Feinbiochemica,
Heidelberg

Cefacetril - 997 µg/mg - Ciba Geigy Ltd.

Bay VP 2674 - 904 µg/mg - Bayer AG.

Zur Herstellung der Stammlösungen wurden vom Gentamicin 335 mg, vom Cefacetril 200,6 mg und vom Bay VP 2674 221 mg pro 100 ml Aqua dest. eingewogen und in Lösung gebracht, das entspricht jeweils einer Konzentration von 2000 µg/ml. Daraus wurden die Verdünnungsreihen nach folgendem Schema erstellt:

Tab. 1:

Anleitung zur Herstellung der Verdünnungsreihen

Mischung						
Wirkstoff		Aqua dest. Volumenteile				
Konzentration µg/ml	Menge Volumenteile					
2000	6,4	3,6	10	1280	128	7
1280	2	2	4	640	64	6
1280	1	3	4	320	32	5
1280	1	7	8	160	16	4
160	2	2	4	80	8	3
160	1	3	4	40	4	2
160	1	7	8	20	2	1
20	2	2	4	10	1	0
20	1	3	4	5	0,5	-1
20	1	7	8			
etc.						

Jede Verdünnungsstufe hat also die halbe Konzentration der vorhergegangenen. Für *Staphylococcus aureus* wurden von Gentamicin und Bay VP 2674 Verdünnungen bis einschließlich 0,03906 µg/ml (Endkonzentration 0,0039 µg/ml) und von Cefacetril bis einschließlich 0,3125 µg/ml (Endkonzentration 0,0313 µg/ml) hergestellt, anschließend bei - 12 °C eingefroren und nach Bedarf aufgetaut.

Für die Nährböden mußte pro Platte mit einem Verbrauch von ca. 20 ml Medium gerechnet werden: 18 ml Nähragar, die restlichen 2 ml aus der entsprechenden Verdünnungsstufe des zu prüfenden Therapeutikums. Als Grundlage für die Nährböden diente Mueller-Hinton-Agar (Merck No. 5437), bestehend aus:

5,0 g/l Fleischinfus

17,5 g/l Caseinhydrolysat

1,5 g/l Stärke

12,5 g/l Agar Agar.

36,5 g davon wurden in 1 l Aqua dest. aufgekocht bis die Lösung klar war, anschließend autoklaviert und wenn der Nährboden nicht sofort weiterverarbeitet wurde, im Kühlschrank bei ca. 4°C gelagert. Zum Gebrauch wurde der Mueller-Hinton-Agar im Wasserbad bei einer Temperatur von $50 \pm 2^{\circ}\text{C}$ flüssig gehalten. Ca. 7 % frisch gewonnenes, defibrinisiertes Blut wurden zugegeben. Es stammte

von gesunden Klinik - Kühen und wurde möglichst steril entnommen. Dabei mußte die zu einem Viertel mit Glasperlen gefüllte Flasche laufend, auch während der Blutentnahme und noch 10 Minuten danach, rotiert werden, um ein Verklumpen zu verhindern und eine vollständige Defibrination zu sichern. Anschließend wurde das Blut ca. 30 Minuten im Kühlschrank abgekühlt. Beim Mischen mit dem Nährmedium war es besser, wenn der Agar statt der in der DIN - Norm vorgeschlagenen Temperatur ($50 \pm 2^{\circ}\text{C}$) nur $40 - 45^{\circ}\text{C}$ hatte, sonst kam es leicht zu einer hitzebedingten Denaturierung des Bluteiweißes.

Im Wasserbad erfolgte dann die Weiterverarbeitung. In Erlenmeyer - Kolben wurden 9 Teile des Agars mit je 1 Teil der Verdünnungsstufe des Wirkstoffes vermengt und sofort darauf die Platten gegossen und abgeflammt. Bei jeder Wirkstoffreihe wurde auch eine Platte ohne Chemotherapeutika zur Kontrolle mitgeführt. Die Petrischalen waren zuvor mit dem Datum, der Konzentration des Wirkstoffes und 6 Kreisen mit einem Radius von ca. 1,25 cm per Schablone beschriftet worden. Einer der Kreise stand für den Kontrollstamm, die anderen fünf bekamen die Tagebuchnummern der

jeweilig geprüften Keime. Die fertigen Platten wurden ausnahmslos am gleichen Tag verbraucht.

Vor dem Beimpfen mußten Keimsuspensionen von jeweils ca. 10^7 vermehrungsfähigen Keimen pro 1 ml hergestellt werden. Das Einstellen der Keimzahl erfolgte am vorhergehenden Tag. Die Mannit-Kochsalz-Phenolrot-Platten wurden nach abermaligem Bebrüten für 24 Stunden bei 37°C mit jeweils 4 ml physiologischer Kochsalzlösung begossen. Ein in Alkohol getauchter und abgeflammter Glasspatel wurde zum vorsichtigen Aufrühren der Keime benützt, die danach mit einem Großteil der Suspension in je ein Reagenzglas pipettiert wurden. Die von jedem Keim benötigten 9 Verdünnungsstufen wurden hergestellt, indem weitere 9 Reagenzgläser mit je 0,9 ml physiologischer Kochsalzlösung jedem Keim zugeordnet wurden. Vom Glas mit der höheren Konzentration wurden dann je 0,1 ml der Keimsuspension in das nächst niedrigere pipettiert und gründlich durchmischt.

Aus jeder Verdünnung (10^{-1} bis 10^{-9}) wurde anschließend 0,1 ml auf ASS - Agar (s. 2. 2. 2.) ausgebracht und mit einem sterilen Glasspatel gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt. Nach

24 Stunden Bebrüten bei 37°C wurden die Platten ausgewertet.

Man geht davon aus, daß alle vermehrungsfähigen Keime eine Kolonie gebildet haben. Die Platte, deren Koloniezahl zwischen 10 und 100 lag, wurde ausgezählt und das Ergebnis mit 10 multipliziert (es wurden ja nur 0,1 ml ausgestrichen). So erhielt man die Anzahl der vermehrungsfähigen Keime pro ml der ausgezählten Verdünnungsstufe. Die Keimzahl der ursprünglichen Suspension ließ sich durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor errechnen und etwaige Abweichungen von der geforderten Konzentration von 10^7 Keimen / ml korrigieren. Das Einstellen der Keimzahl ist wichtig; eine zu geringe Zahl kann eine Wachstumshemmung, eine zu hohe durch Enzymproduktion und Abbau des Wirkstoffes einen zu hohen MHK-Wert vortäuschen.

Beim Ausstreichen der Bakterien-Suspension auf die wirkstoffhaltigen Platten mußte, um die vorgeschriebene Dichte von ca. 10^4 Keimen / $0,5 \text{ cm}^2$ zu gewährleisten, Folgendes beachtet werden: mit normierten Ösen wurden 0,01 ml Flüssigkeit, das heißt ca. 10^5 Keime, aus der eingestellten

Suspension aufgenommen und auf ca. 5 cm², den angezeichneten Kreisflächen, aufgebracht. Zum Schluß wurden die Platten bei einer Temperatur von 37°C über 16 - 20 Stunden bebrütet.

Nach der DIN - Empfehlung gibt der MHK - Wert die niedrigste Wirkstoffkonzentration in µg/ml an, bei der makroskopisch sichtbares Wachstum verhindert wird. Bei der Auswertung wurden also die Werte festgehalten, bei denen kein Wachstum mehr erkennbar war, kaum sichtbare oder Einzelkolonien wurden nicht berücksichtigt.

2. 3. Untersuchungsergebnisse

2. 3. 1. Mannit - Kochsalz - Phenolrot - Agar:

Von den 225 kulturell auf Blutagar als Staphylokokken identifizierten Stämmen wuchsen 9 ohne, die restlichen 216 und der Kontrollstamm mit Mannitvergärung und Säureproduktion auf dem Selektivnährboden. Das sind 4 % MKP - negative Stämme.

2. 3. 2. Koagulase - Test :

Nur 15 der 225 Staphylokokken - Stämme (6,7 %) waren koagulase - negativ, der Kontrollstamm und alle anderen koagulase - positiv. Es fiel auf, daß das Testergebnis nicht immer mit dem Verhalten gegenüber Mannit in Einklang stand.

Tab. 2

Koagulase- und MKP- negative Staphylokokken-Stämme

Keim No.	Koagulase	MKP
43	-	
45	-	-
50	-	
54	-	
107		-
113		-
117		-
128	-	-
155		-
159	-	-
173	-	
174b	-	
175	-	
176b	-	
177	-	
189		-
191	-	-
211		-
218	-	
224	-	
225	-	

MKP-positiv und koagulase-positiv	205	90,7 %
MKP-positiv und koagulase-negativ	12	5,3 %
MKP-negativ und koagulase-positiv	6	2,7 %
MKP-negativ und koagulase-negativ	3	1,3 %

Die beiden Stämme No. 174 und 176 wuchsen nach der Überprüfung auf dem Selektivnährboden auf Blutagar in verschiedenen Kolonien, jeweils mit zweiteiliger Hämolysezone, aber einmal eher spitzkegelig, dunklerfarben und prominent, das andere Mal eher weißlich, breiig und flach. Beide Formen wurden abermals auf den MKP-Nährboden verbracht und wuchsen unter Mannitvergärung, aber nur je eine Form war koagulase-positiv. Nur mit den letzten, also pathogenen Stämmen wurde weitergearbeitet.

Außerdem fiel auf, daß 10 Staphylokokkenstämme, die ursprünglich sehr wohl eine α - und β -Hämolyse zeigten, wenn sie vom MKP-Nährboden wieder auf Blutplatten überimpft wurden, keine Ent- bzw. Verfärbung derselben mehr bewirkten. Nur ein Stamm davon (No. 218) war koagulase-negativ, alle anderen koagulase-positiv.

Das Verhalten aller MKP-negativen und / oder

koagulase-negativen Stämme wurde gesondert weiterverfolgt. Aus diesem Grund erübrigt sich auch eine Überprüfung der negativ ausgefallenen Clumping-Factor-Tests durch den Röhrchen-Koagulase-Test.

2. 3. 3. Antibiotogramm

Außer für Bay VP 2674, wo die Hemmhofdurchmesser vermerkt wurden, lagen bei allen anderen Chemotherapeutika Grenzwerte vor. Polymyxin wurde nicht in die Bewertung mit einbezogen, da sein Wirkungsspektrum gram-negative Keime betrifft.

Tab. 3

Resistenzverhalten gegen verschiedene Chemotherapeutika

	207 Staphylococcus aureus-Stämme (incl. Teststamm)				19 MKP- und / oder koagulase-negative Stämme			
	resistent		mäßig empfindlich		resistent		mäßig empfindlich	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Ampicillin	36	17,4	14	6,8	6	31,6	2	10,5
Penicillin	53	25,6			8	42,1		
Gentamicin			2	1,0			1	5,3
Erythromycin			2	1,0	1	5,3		
Tetracyclin	4	1,9	5	2,4	2	10,5		
Nitrofurantoin	2	1,0	1	0,5				
Chloramphenicol	12	5,8	1	0,5	1	5,3		
Cotrimoxazol	2	1,0	1	0,5				
Oxacillin	2	1,0	1	0,5				
Streptomycin	21	10,1	43	20,8	4	21,0	3	15,8
Neomycin			1	0,5				
Spectinomycin	16	7,7			3	15,8		
Lincomycin	5	2,4	3	1,5				
Sulphamethizol	68	32,9	20	9,7	9	47,4	1	5,3
Tylosin	2	1,0	2	1,0	1	5,3		
Cefacetril								

Die beiden gegen Gentamicin nur mäßig empfindlichen Stämme haben die No. 36 und 197, der mäßig empfindliche koagulase - negative Stamm die No. 43. Bei Cefacetril waren alle Keime empfindlich. Für Bay VP 2674 wurden folgende Werte vermerkt:

Tab. 4

Hemmhofdurchmesser bei Bay VP 2674

Durchmesser in mm	Staphylococcus aureus- Stämme		restl. Keime	
	n	%	n	%
22	4	1,9		
23	1	0,5		
24	8	2,9		
25	15	7,2	2	10,5
26	11	5,3	2	10,5
27	29	14,0	4	21,0
28	22	10,6	3	15,8
29	11	5,3	3	15,8
30	54	26,1	3	15,8
31	7	3,4	1	5,3
32	18	8,7		
33	1	0,5	1	5,3
34	1	0,5		
35	25	12,1		
und mehr				

Der Teststamm war resistent gegen Penicillin, Ampicillin und Sulphamethizol, mäßig empfindlich gegen Streptomycin und hatte bei Bay VP 2674 einen Hemmhofdurchmesser von 28 mm.

2. 3. 4. Reihenverdünnungstest

In folgenden Tabellen sind die Ergebnisse aufgeführt, in Klammern jeweils die Stämme, die nicht als *Staphylococcus aureus* gelten konnten durch die negativen Koagulase- und/oder MKP-Ergebnisse.

2. 3. 4. 1 Gentamicin:

Tab. 5: MHK bei Gentamicin

MHK	0,02	2	1,0
µg/ml	0,03	15 (3)	7,3 (15,8)
	0,06	30 (5)	14,6 (26,3)
	0,125	106 (6)	51,4 (31,6)
	0,25	49 (5)	23,8 (26,3)
	0,5	4	1,9
		206 (19)	100,0%(100,0%)

arithmetisches Mittel: 0,15 µg/ml (0,13 µg/ml)

Medianwert: 0,125µg/ml (0,125µg/ml)

Modalwert: 0,125µg/ml (0,125µg/ml)

Der Kontrollstamm hatte sein arithmetisches Mittel bei 0,22 µg/ml, sein Median- und Modalwert betrugen 0,25 µg/ml.

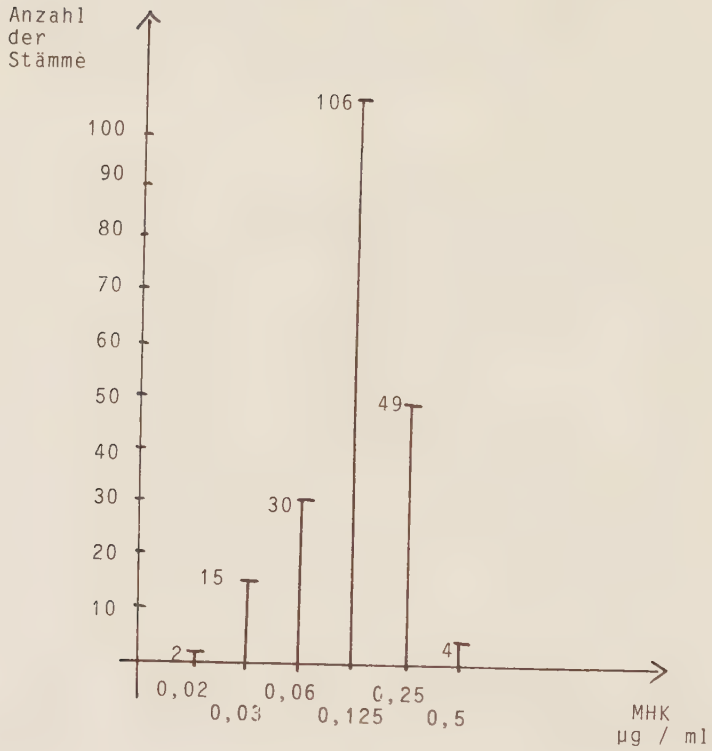


Abb. 1: Gentamicin

MHK und Anzahl der Stämme

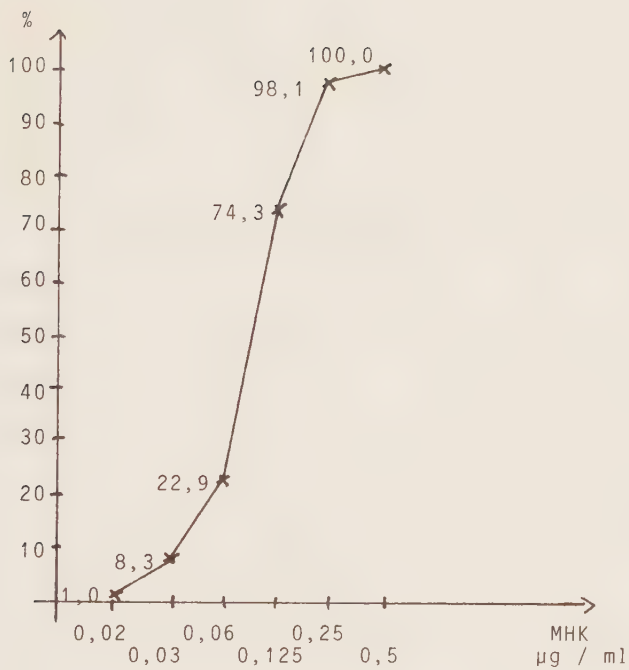


Abb. 2: Gentamicin

kumulative MHK - Werte

n = 206

2. 3. 4. 2. Cefacetril:

Tab. 6: MHK bei Cefacetril

MHK	0,06	1		0,5	
µg/ml	0,125	3		1,5	
	0,25	32	(2)	15,5	(10,5)
	0,5	57	(5)	27,6	(26,3)
	1	84	(8)	40,8	(42,1)
	2	26	(4)	12,6	(21,1)
	4	3		1,5	
		206	(19)	100,0%	(100,0%)

arithmetisches Mittel: 0,9 µg/ml (1,0 µg/ml)

Medianwert: 1 µg/ml (1 µg/ml)

Modalwert: 1 µg/ml (1 µg/ml)

Der Kontrollstamm hatte sein arithmetisches Mittel, den Median- und den Modalwert bei 1 µg / ml.

Anzahl
der
Stämme

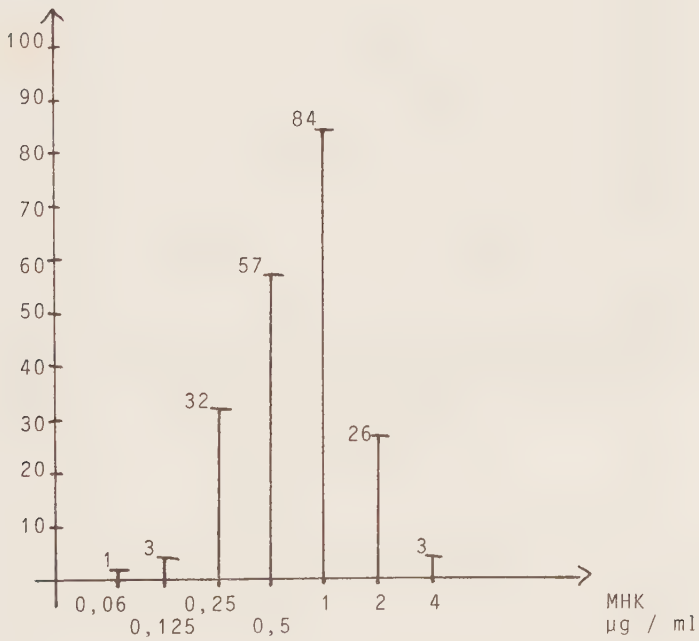


Abb. 3: Cefacetril

MHK und Anzahl der Stämme

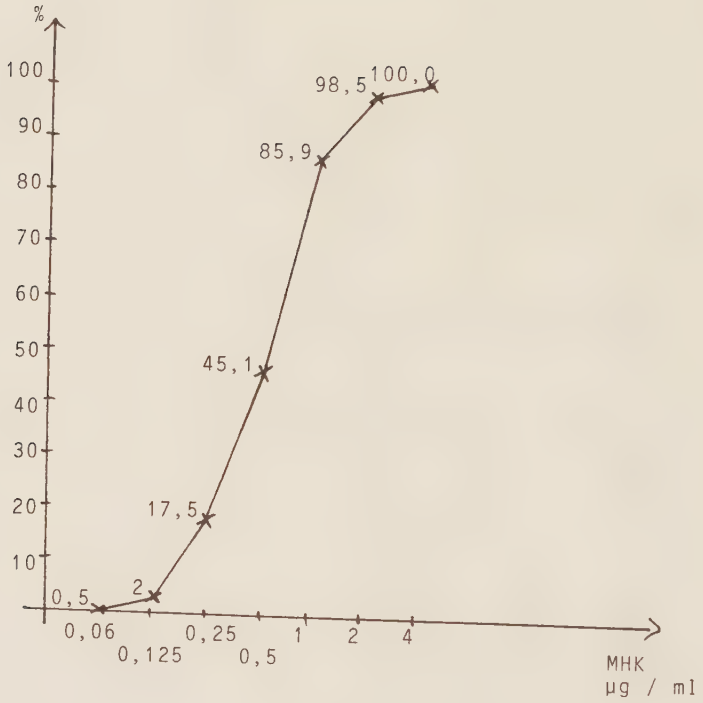


Abb. 4: Cefacetril

kumulative MHK - Werte

n = 206

2. 3. 4. 3. Bay VP 2674

Tab. 7: MHK bei Bay VP 2674

MHK	0,02	3		1,5	
	u. kleiner				
µg/ml	0,03	17	(1)	8,3	(5,3)
	0,06	49	(2)	23,8	(10,5)
	0,125	51	(4)	24,7	(21,1)
	0,25	60	(9)	29,1	(47,3)
	0,5	26	(1)	12,6	(5,3)
	1		(2)		(10,5)
		206	(19)	100,0%	(100,0%)

arithmetisches Mittel: 0,185 µg/ml (0,285 µg/ml)

Medianwert: 0,125 µg/ml (0,25 µg/ml)

Modalwert: 0,25 µg/ml (0,25 µg/ml)

Der Kontrollstamm hatte sein arithmetisches Mittel bei 0,159 µg/ml, sein Median- und Modalwert betrugen 0,125 µg/ml.

Anzahl
der
Stämme

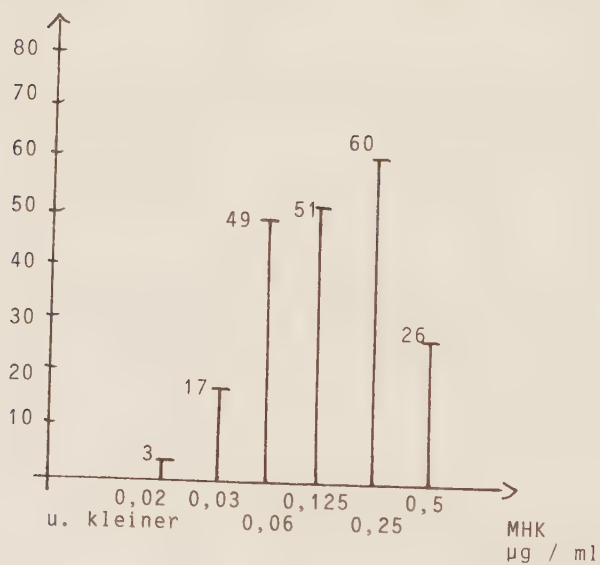


Abb. 5: Bay VP 2674

MHK und Anzahl der Stämme

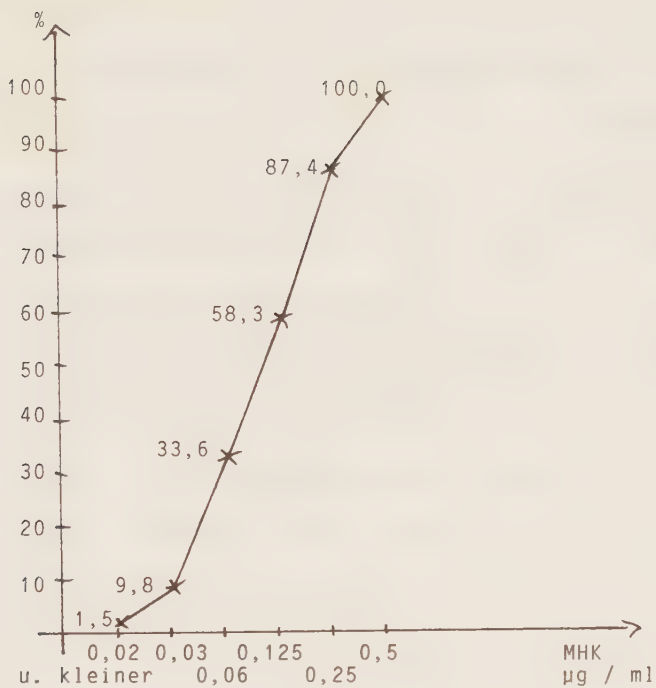


Abb. 6: Bay VP 2674

kumulative MHK - Werte

$n = 206$

3. Diskussion

Da gerade Staphylokokken, bekannt für ihre große Anpassungsfähigkeit (67), immer wieder Probleme bei der Mastitisbekämpfung der Rinder darstellen, ist es wichtig, neuere Chemotherapeutika auf deren Einsatzmöglichkeit zu überprüfen.

Von den 225 aus Viertelgemelksproben euterkranker Kühe gewonnenen und kulturmorphologisch und auf Grund ihres Hämolyseverhaltens zu den Staphylokokken gerechneten Stämmen bestanden 206 sowohl die Überprüfung auf dem Mannit - Kochsalz - Phenolrot - Agar als auch den Koagulase - Test. Das sind 91,6 %. Die anderen wurden ohne weitere Differenzierung aus der engeren Wahl ausgeschlossen und nur interessehalber weiterüberprüft.

3. 1. Antibiotogramm

Das Antibiotogramm sollte einen Überblick verschaffen, bevor die eigentliche Aufgabe - Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen bei Gentamicin, Cefacetril und Bay VP 2674 - in Angriff genommen wurde.

Bei anderen zum Vergleich herangezogenen Versuchsergebnissen wurde darauf geachtet, daß möglichst gleiche Wirkstoffkonzentrationen auf den Filterpapierblättchen verwendet wurden.

Ampicillin: Es gilt als penicillinase - empfindliches Breitspektrumantibiotikum (52). Fast alle penicillin - resistenten Keime waren auch ampicillin - resistent (17,4 %) oder nur mäßig empfindlich (6,8 %).

Penicillin: Der Prozentsatz der penicillin - resistenten Staphylokokken - 25,6 % - liegt ähnlich hoch wie bei anderen Versuchen. So fanden 1965 F u j i k u r a und S h i b a t a 16,6 % (von 306 Stämmen), im gleichen Jahr A b o - E l n a g a u. K a n d l e r 35 % (von 97) resistente Staphylokokken. K o p p u. G e d e k (1967) stellten bei ihren Versuchen 25,5 % gegen Penicillin unempfindliche

Staphylokokken von 329 Stämmen fest.
G a n t a m et al. (1979) gaben an,
daß 15 - 22 % ihrer 87 Staphylococcus
aureus - Stämme penicillin - resistent
waren.

Gentamicin: Interessant waren die beiden Stämme
No. 36 und 197 durch ihre mäßige Empfind-
lichkeit im Antibiotogramm. Ihr Verhalten
bei der Agarverdünnungsmethode war von
besonderem Interesse (s. 3. 2. 1.).
Alle anderen Staphylokokken waren em-
pfindlich. G a n t a m et al. (1979)
hatten von ihren untersuchten Stämmen
keine Resistenzen zu berichten. Bei
F o r t h et al. (1980) schneiden
mit weniger als 10 % resistenten
Stämmen Staphylokokken in einer allge-
meinen Beurteilung sehr gut ab.

Erythromycin und Neomycin waren, neben Gentamicin,
die einzigen auf dem Markt seit längerem
etablierten Antibiotika ohne Resistenzen.
Allerdings waren 1 % gegen Erythromycin
und 0,5 % gegen Neomycin nur mäßig em-
pfindlich. Bei G a n t a m et al. (1979)
waren alle 87 Stämme sensibel.

Tetracyclin: Das Ergebnis von 1,9 % resistenten und 2,4 % mäßig empfindlichen Staphylococcus aureus - Stämmen paßt gleichfalls zum Ergebnis von G a n t a m et al. (1979), deren Keime zu 98 % empfindlich waren. Auch F u j i k u r a u. S h i b a t a (1965) und K o p p u. G e d e k (1967) hatten nur 0,6 % (aus 306) bzw. 4,6 % (aus 329 Stämmen) resistente Staphylokokken. W e i g t u. K r a m e r (1967) fanden allerdings mit 28 % von 111 Stämmen wesentlich mehr unempfindliche Staphylococcus aureus - Stämme.

Nitrofurantoin, Cotrimoxazol, Oxacillin, Lincomycin und Tylosin hatten alle nur geringe Resistenzquoten vorzuweisen (maximal 2,4 %) und bieten sich zur gezielten Therapie an.

Chloramphenicol: Mit 5,8 % als resistent und 0,5 % als mäßig empfindlich eingestuften Stämmen liegt auch dieses Chemotherapeutikum im Bereich bisher gefundener Versuchsergebnisse, z.B. W e i g t u. K r a m e r (1967) 6 % von 111 Stämmen,

G a n t a m et al. (1979) 0 % von 87. K u s c h i n s k y und L ü l l m a n n stuften es 1976 als mäßig wirksam bei *Staphylococcus aureus* ein. Seit August 1984 ist das Chemotherapeutikum für Rinder, die der Milcherzeugung dienen, verboten und kommt deshalb für eine Therapie nicht mehr in Frage.

Streptomycin: Von den 207 überprüften Keimen (incl. Teststamm) waren 10,1 % resistent und 20,8 % mäßig empfindlich. Deutlich geringere Quoten fanden G e d e k (1972) - 0,4 % resistent von 225 - und M a y e r (1975) - 2 % von 297 . G a n t a m et al. (1979) hatten von 2 % gegen Streptomycin resistenten Stämmen berichtet.

Von den 53 gegen Penicillin resistenten *Staphylococcus aureus* - Stämmen waren 20,8 % gleichzeitig gegen Streptomycin resistent, 16,9 % gleichzeitig nur mäßig empfindlich. Das sind 5,3 % bzw. 4,3 % von allen untersuchten Stämmen, insgesamt also 9,6 %. Dies scheint für

den Einsatz bei Staphylokokken - Mastitiden zu hoch, um weiterhin als Mittel der Wahl zu gelten.

Sulphamethizol: 32,9 % resistente und 9,7 % mäßig empfindliche Stämme weisen das Medikament als ungeeignet für eine Chemotherapie von Staphylococcus aureus - Infektionen aus. K u s c h i n s k i und L ü l l m a n n (1976) stufen es noch als mäßig geeignet ein.

Cefacetril: Wie bei K l o s s o w s k a und W i s n i o w s k i (1982) waren auch hier alle Stämme empfindlich.

Bay VP 2674: Die notierten Hemmhofdurchmesser können noch nicht mit Sicherheit als sensibel, resistent etc. eingeordnet werden, da weiteres, genaueres Zahlenmaterial, das auch zu einer exakten Auswertung der MHK - Werte nötig wäre, fehlt. B a y e r (1985) stellt 15 mm Hemmhofdurchmesser als Grenzwert für Ciprofloxacin fest, ein für die Humanmedizin entwickeltes, eng verwandtes

Chinolonicarbonsäurederivat.

Die jeweils deutlichen, in der Regel sehr weiten Hemmhöfe legen eine Einstufung als " empfindlich " für alle geprüften Stämme nahe.

3. 2. Reihenverdünnungstest

In Form der Agar - Verdünnungsmethode wurden die drei Chemotherapeutika Gentamicin, Cefacetril und Bay VP 2674 genau bezüglich ihrer Hemmwirkung auf das Wachstum von *Staphylococcus aureus* - Kulturen überprüft.

3. 2. 1. Gentamicin

Die hier gefundenen minimalen Hemmkonzentrationen lagen unter $0,5 \mu\text{g} / \text{ml}$, mit dem arithmetischen Mittel bei $0,145 \mu\text{g} / \text{ml}$.

Die beiden bei dem Antibiotogramm in der Voruntersuchung aufgefallenen Stämme No. 36 und 197 hatten MHK - Werte von $0,125$ und $0,25 \mu\text{g} / \text{ml}$.

In der DIN Vorschrift 58940 Teil 4 (1981) werden die Grenzwerte für Gentamicin angegeben. Danach sind Keime mit MHK - Werten bis zu $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ empfindlich, über $4 \mu\text{g} / \text{ml}$ unempfindlich und dazwischenmäßig empfindlich. Demnach können alle untersuchten *Staphylococcus aureus* - Stämme als empfindlich eingestuft werden.

W a l t e r u. H e i l m e i e r (1975) geben an, daß *Staphylococcus aureus* - Stämme minimale

Hemmkonzentrationen von 0,8 bis 2 μg / ml hatten. Offen bleibt die Herkunft der Stämme - humane gelten als resistenter als bovine (57) - und ob die Agar- oder Bouillonverdünnungsmethode angewendet wurde.

3. 2. 2. Cefacetril

Die MHK - Werte dieser Untersuchung liegen unter 4 µg / ml, der Modalwert beträgt 1 µg / ml.

Da S c h l u e p u. H e i m (1980) feststellten, daß intramammär ein Wirkstoffspiegel von über 16 µg / ml für 24 Stunden aufrecht erhalten werden kann, wurde der Grenzwert aus der Humanmedizin - 16 µg / ml - übernommen. Da laut Definition in Teil 1 der DIN Vorschrift 58940 ein Keim dann als empfindlich gilt, wenn die minimale Hemmkonzentration niedriger ist als die unter therapeutischen Bedingungen bei üblicher Dosierung in vivo erreichbaren Wirkstoffspiegel am Ort der gewünschten Wirkung, können alle in dieser Arbeit überprüften 206 Staphylococcus aureus - Stämme als empfindlich eingestuft werden.

1974 fanden K n ü s e l et al. bei 4 Staphylococcus aureus - Stämmen dreimal eine minimale Hemmkonzentration von 0,4, einmal von 3,0 µg/ml.

1977 stellten Z i v u. N o u w s bei 62 penicillin - sensiblen Staphylokokken MHK - Werte von 0,12, bei 23 penicillin - resistenten von 0,5 µg / ml.

1978 untersuchte G e d e k 179 penicillinase-positive und -negative Stämme mit der Agarverdünnungsmethode, ohne resistente Keime zu finden. Die Werte von 3 Staphylococcus aureus - Stämmen lagen bei 0,25, von 90 bei 0,5, von 85 bei 1 und von 1 bei 2 $\mu\text{g} / \text{ml}$. In den höheren Stufen fanden sich vor allem Penicillinasebildner.

1979 gaben S c h l u e p et al. minimale Hemmkonzentrationen von 0,1 bis 0,4 $\mu\text{g} / \text{ml}$ für empfindliche Keime an (75), im gleichen Jahr S c h l u e p für Staphylococcus aureus 0,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (74).

1983 stellte Z i v fest, daß 62 penicillinase - negative Stämme Werte von 0,12 bis 1 $\mu\text{g} / \text{ml}$, 23 penicillinase - positive Stämme von 0,12 bis 4 $\mu\text{g} / \text{ml}$ hatten.

1985 veröffentlichte G e d e k von 224 Staphylococcus aureus - Isolaten in der Agarverdünnungsmethode gewonnene MHK - Werte in einer Variationsbreite von 0,125 bis 2 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Auch er stellte besonders in höheren Stufen Penicillinasebildner fest, fand aber keine resistenten Keime. Die Ergebnisse der eigenen Untersuchung stimmen im

wesentlichen mit den von G e d e k beschriebenen
und anschließend kurz aufgeführten überein.

5	Stämme	(2,2 %)	lagen bei	0,125 µg / ml
15	"	(6,7 %)	" "	0,25 µg / ml
107	"	(47,8 %)	" "	0,5 µg / ml
94	"	(42 %)	" "	1 µg / ml
3	"	(1,3 %)	" "	2 µg / ml

Der Modalwert wurde mit 0,5 µg / ml angegeben.

3. 2. 3. Bay VP 2674

Die Ergebnisse dieser Untersuchung liegen unter $0,5 \mu\text{g/ml}$, der Medianwert beträgt $0,125 \mu\text{g / ml}$. Eine endgültige Beurteilung als empfindlich ist noch nicht möglich. Wie beim Antibiotogramm (siehe 3.1.) schon ausgeführt, fehlen Werte über das Verhalten des Chemotherapeutikums in vivo.

Die einzig vorliegenden Vergleichswerte stammen aus der Produktinformation zum Medikament von 1984. Damals wurden vom Rind 15 Staphylococcus aureus - Stämme mit minimalen Hemmkonzentrationen von $0,1$ bis $0,5 \mu\text{g / ml}$ und 4 weitere mit $0,06$ bis $0,12 \mu\text{g / ml}$ untersucht. Der Medianwert der ersten Gruppe betrug $0,25 \mu\text{g / ml}$, der der zweiten $0,12 \mu\text{g / ml}$.

Die bei der Untersuchung des Resistenzverhaltens von 225 aus Kuhmilch gewonnenen Staphylokokken-Isolaten festgestellten Ergebnisse waren für alle drei überprüften Substanzen außerordentlich vielversprechend. Ihr Einsatz in der Praxis und die weitere Resistenzentwicklung müssen über die letztliche Eignung bei Mastitiden des Rindes entscheiden.

Zusammenfassung:

Von 225 untersuchten aus Rinder-Mastitis-Milchproben gewonnenen Staphylokokken-Isolaten wurden 206 durch Mannit-Kochsalz-Phenolrot-Selektivnährboden und Koagulase-Test als *Staphylococcus aureus* identifiziert. Davon waren alle gegen Gentamicin und Cefacetril empfindlich und wurden von Bay VP 2674 im Wachstum negativ beeinflusst.

Die minimalen Hemmkonzentrationen reichten von 0,02 bis 0,5 µg / ml (arithmetisches Mittel: 0,15 µg / ml) für Gentamicin, von 0,06 bis 4 µg / ml (0,9 µg / ml) für Cefacetril und von 0,01 bis 1 µg / ml (0,185 µg / ml) für Bay VP 2674.

Summary

In Vitro Susceptibility of *Staphylococcus aureus* - Isolates of Mastitis - Milk to Gentamicin, Cephacetrile and Bay VP 2674

Of 225 investigated staphylococci, taken from mastitis milk-samples of cows, 206 strains were identified as *staphylococcus aureus* by Mannitol - Salt - Phenolred - Agar and the slide - test for coagulase. All were susceptible to Gentamicin and Cephacetrile and were negatively influenced in their growth by Bay VP 2674.

The minimal inhibitory concentrations ranged from 0.02 to 0.5 µg / ml (average at 0.15 µg / ml) for Gentamicin, from 0.06 to 4 µg / ml (0.9 µg / ml) for Cephacetrile and from 0.01 to 1 µg / ml (0.0185 µg / ml) for Bay Vp 2674.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. ABO - ELNAGA G., O. KANDLER (1965)
Zur Charakterisierung der in Milch verbreiteten
Staphylokokken
Zbl. Bakt. I. Abt., Orig., 196, 438 - 451
2. AMSTUTZ H. E. (1980)
Bovine Medicine and Surgery, Vol. 2, 1064 ff
American Veterinary Publications Inc., Santa Barbara
3. ANGELOV L., G. BOZHKOVA, M. DANOV (1983)
Cefacetrile treatment of clinical mastitis in cows
Veterinarnomeditsinski Nauki, 20, 68 - 75
(engl. Zusammenfassung)
4. BAYER AG
persönliche Mitteilung vom 14.3.1985
5. BAY VP 2674 - PRODUKTINFORMATION (1984)
Bayer AG, 31.8.1984
6. BBL^R- SENSI - DISC^R MICROBIAL SUSCEPTIBILITY TEST DISCS -
PRODUKTINFORMATION (July 1981)
Becton, Dickinson und Co.

7. BIBERSTEIN E.L., S.S. JANG, D.C. HIRSH (1984)
Species Distribution of Coagulase - Positive Staphylococci in Animals
Journal of Clinical Microbiology, Vol. 15, No. 5, 610-615
8. BLOBEL H., T. SCHLIESSER (1980)
Handbuch der bakteriellen Infektion bei Tieren
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, Bd. II
9. BLOOD D.C., J.A. HENDERSON, O.M. RADOSTITIS (1979)
Veterinary Medicine
Bailliére Tindall, London, 370 ff
10. BRANDIS H., H.J. OTTE (1984)
Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 360 ff
11. BRÜCKLER J., U. BERLICH, W. SCHAEGER, H. BLOBEL (1981)
" Clumping - Factor " Reaktionen von Staphylococcus aureus verschiedener Herkunft in Plasma- und Fibrinogenpräparationen
Zbl. Bakt. I. Abt., Orig. A, 251, 27 - 32
12. BUCHANAN R. E., N.E. GIBBONS (1974)
Bergey's Manual of Determinative Bacteriology
The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 8 th Edition

13. CARLI S., O. SONZOGNI, A. INVERNIZZI, G. GRANATA,
P. PIGNATELLI (1983)
Blood concentrations and milk excretion of cefacetrile
given by intramammary route to cows
Atti della Societa Italiana delle Scienze Veterinarie 37,
250 - 252
(englische Zusammenfassung)
14. DEVRIESE L.A., V. HÁJEK, P. OEDING, S.A. MEYER,
K.H. SCHLEIFER (1978)
Staphylococcus hyicus (Sompolinsky 1953) comb. nov.
and Staphylococcus hyicus subsp. chromogenes subsp. nov.
Internat. J. of Syst. Bact., 28, No. 4, 482 - 490
15. DEVRIESE L.A., B. POUTREL, R. KILPPER - BÄLZ,
K.H. SCHLEIFER (1983)
Staphylococcus gallinarum and Staphylococcus caprae,
Two New Species from Animals
Internat. J. of Syst. Bact., 33, No. 3, 480 - 486
16. DITTUS G. (1969)
Untersuchungen über die Antibiotika-Resistenz euter-
pathogener Staphylokokken
Inaugural-Dissertation, München

- 17 . DVOŘÁČEK K., Z. MODR, O. SCHMIDT, A. NEČÁSKOVÁ (1974)
Contribution to the Pharmacokinetics of a New Cephalo-
sporin Derivative
Arzneim.-Forschung, 24, 1468 - 1470
- 18 . EIKMEIER H. (1980)
Therapie innerer Krankheiten der Haustiere
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 195 ff
- 19 . ELEK S. D. (1959)
Staphylococcus pyogenes
E. und S. Livingstone LTD., Edinburgh und London
- 20 . FACHNORMENAUSSCHUSS MEDIZIN IM DTSCH. NORMENAUSSCHUSS
DIN 58 940 (1976, 1979, 1981)
Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen
Krankheitserregern (außer Mykobakterien) gegen
Chemotherapeutika
Beuth Verlag GmbH, Berlin, Köln
- 21 . FLEMMING H., J. KARLE (1984)
persönliche Mitteilung vom 18.7.1984
Ciba - Geigy GmbH

- 22 . FORTH W., D. HENSCHLER, W. RUMMEL (1983)
Pharmakologie und Toxikologie
Wissenschaftsverlag, Bibliographisches Institut,
Mannheim, Wien, Zürich, 4. Auflage
- 23 . FRIMMER M., G. LÄMMER (1969)
Pharmakologie und Toxikologie
F. K. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York, 2.Auflage,
60 - 64, 102, 298
- 24 . FUJIKURA, SHIBATA (1965)
Zitat nach G. Dittus (1969)
Untersuchungen über die Antibiotika-Resistenz euter-
pathogener Staphylokokken
Inaugural-Dissertation, München
- 25 . GANTAM O. P., M.P.KAPUR, R.K.KAUSHIK (1979)
Antibiogram of Staphylococcus aureus isolates of
bovine mammary origin
Haryana Veterinarian, 18, 121 - 123
(engl. Zusammenfassung)
- 26 . GEDEK W., R. DUNKEL, L. KOTTER (1964)
Zum Vorkommen antibiotikaresistenter Stämme
der Familie Micrococcaceae in Kuhmilch
Tierärztl. Umsch., 19, 337 - 340

- 27 . GEDEK W. (1972)

Die Staphylokokken-Mastitis bei Haustieren
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

- 28 . GEDEK W. (1978)

Penicillinase-Bildung und minimale Hemmkonzentration
von Betalaktam-Antibiotika bei euterpathogenen
Staphylokokken
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 91, 367 - 369

- 29 . GEDEK W. (1981)

Empfindlichkeitsprüfung von Mastitiserregern
gegenüber Penicillinen
Tierärztl. Umsch., 36, 767 - 770

- 30 . GEDEK W. (1985)

In-vitro-Profile der neuen Mastitistherapeutika
Cephacetril, Cefoperazon und Trimethoprim
Prakt. Tierarzt, 4, 297 - 300

- 31 . GERLACH H. (1967)

Zur Resistenztestung gegen Antibiotika und Sulfonamide
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 80, 231 - 234

32. GRAVERT H.O. (1983)
Die Milch
Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, 216
33. GOODMAN L.S., A. GILMAN (1975)
The Pharmacological Basis of Therapeutics
Macmillan Publishing Co., Inc., New York, 5 th Edition
1096, 1108, 1172 ff
34. HÁJEK V. (1976)
Staphylococcus intermedius, a New Species Isolated from
Animals
Internat. J. of Syst. Bact., 26, No.4, 401 - 408
35. HAMÓRI D. (1983)
Constitutional disorders and hereditary diseases in
domestic animals
Elsevier scientific publishing company, Amsterdam
36. HEIDRICH H.D., J. GRUNER (1982)
Rinderkrankheiten
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 188 ff
37. HEIDRICH H.J., W. RENK (1963)
Krankheiten der Milchdrüse bei Haustieren
Paul Parey Verlag, Berlin, Hamburg, 270 ff, 370, 381, 407

38. HEINEMEYER K. (1967)

Untersuchungen zur Eignung verschiedener Staphylokokken-
Selektivmedien bei der Milchuntersuchung und zur Bildung
antibiotisch wirksamer Substanzen durch koagulase -
negative Stämme

Inaugural-Dissertation, Hannover

39. HILDENBRAND G., C. KRAEMANN, H. GRIMM

Die Bewertung der Chemotherapeutikaempfindlichkeit von
schnellwachsenden Bakterien im Agardiffusionstest nach
der Fehlerminimierungsmethode

Oxoid Deutschland GmbH, Wesel

40. HÖKL J., M. ŠTĚPÁNEK (1965)

Hygiene der Milch und Milcherzeugnisse

VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 291 ff

41. HOWARD J.L. (1981)

Current Veterinary Therapy

Food animal practice

W. B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto

666 ff, 943- 946

42. KLOOS W.E., K.H. SCHLEIFER (1975)

Isolation and Characterization of Staphylococci from
Human Skin

Internat. J. of Syst. Bact., 25, No. 1, 62 - 79

43. KLOOS W.E., K.H. SCHLEIFER, R.H. SMITH (1976)
Characterization of *Staphylococcus sciuri* sp. nov. and
Its Subspecies
Internat. J. of Syst. Bact., 26, No. 1, 22 - 37
44. KLOOS W.E., K.H. SCHLEIFER (1983)
Staphylococcus auricularis sp. nov., an Inhabitant of
the Human External Ear
Internat. J. of Syst. Bact., 33, No. 1, 9 - 11
45. KLOSSOWSKA A., J. WISNIEWSKI (1981)
Treatment of bovine mastitis with cefacetril
Medycyna Weterynaryjna, 37, 12, 739 - 741
(engl. Zusammenfassung)
46. KLOSSOWSKA A., J. WISNIEWSKI (1982)
Sensitivity of mastitis bacteria to cefacetril
Medycyna Weterynaryjna, 38, 1/3, 33 - 34
(englische Zusammenfassung)
47. KNOTHE H., G.A. DETTE (1983)
The Current State of Cephalosporin Antibiotics:
Microbiological Aspects
Infection, 11, Suppl. 1, S 12 - S 15

48. KNÜSEL F., E.A. KONOPKA, J. GELZER, A. ROSSELET (1974)
Antimicrobial Studies in vitro with Cephacetrile, a New
Cephalosporin Derivative
Arzneim.-Forschung, 24, 1451 - 1455
49. KOPP U., W. GEDEK (1967)
Koagulasepositive Staphylokokken aus Kuhmilch
II. Antibiotikaresistente Stämme
Arch. Lbm.hygiene, 18, 274 - 276
50. KRADOLFER F., T. AHRENS, J. GELZER, W. VISCHER,
W. ZIMMERMANN (1974)
Experimentelle Auswertung des neuen Cephalosporin-
Antibiotikums Cephacetril
Arzneim.-Forschung, 24, 1446 - 1451
51. KROIHER K. (1967)
Differenzierung von aus Kuhmilch isolierten koagulase -
positiven Staphylokokken
Inaugural-Dissertation, München
52. KUSCHINSKY G., H. LÜLLMANN (1976)
Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 7. Auflage
289 - 292, 299, 301, 302, 305, 306

53. LARSON B.C., V.R. SMITH (1974)
Lactation
Academic Press, New York, London, Band II, 271 ff
54. LERCHE M. (1966)
Lehrbuch der Tierärztlichen Milchüberwachung
Paul Parey Verlag, Berlin, Hamburg
55. LINSERT H., D. SCHIMMEL, P. KIELSTEIN (1970)
Bakteriolog.-serolog. Laboratorium
Mappe I, III
S. Hirzel Verlag, Leipzig, 565 ff, 236, 247, 284
56. LORBACHER H., G. KIELWEIN, H. BLOBEL (1968)
Lysotoxie und Antibiotogramm bei Staphylokokken vom Rind
Zbl. Vet. Med., B, 16, 47 - 52
57. MAYER S. (1975)
Enterotoxinbildungsvermögen boviner und humaner
Staphylokokken unter Berücksichtigung der Antibiotika-
resistenz und anderer biologischer Eigenschaften
Inaugural-Dissertation, München
58. MERCER H.D., R.H. TESKE (1977)
Special Considerations for the Development of Drugs
for Acute Clinical Mastitis
J. Am. Vet. Med. Ass., 170, No. 10/2, 1190 - 1193

59. MERCK (1980)

Handbuch, Nährböden Merck
Merck, Darmstadt

60. MESSER J. (1961)

Beitrag zur Differenzierung in Milch vorkommender
Staphylokokken
Inaugural-Dissertation, Gießen

61. MESSERLI R. (1982)

Zur Therapie der bakteriell bedingten bovinen Mastitis
mit Cephacetril
Inaugural-Dissertation, Bern (1980)
Milchwissenschaft, 37/3, 164

62. MEYER W. (1966)

Über die Brauchbarkeit des Koagulasetestes mit ver-
schiedenen Plasmaarten zur Differenzierung von Staphylo-
coccus aureus Stämmen
Zbl. Bakt. I. Abt., Orig., 201, 331 - 338

63. MUNCH-PETERSEN E. (1960)

Staphylococcal Coagulase
Zbl. Bakt. I. Abt., Referate, 178, 377 - 399

64. NAIDU T.G., F.H.S. NEWBOULD (1975)
Significance of β -hemolytic Staphylococcus aureus as a
Pathogen to the Bovine Mammary Gland
Zbl. Vet. Med. B, 22, 308 - 317
65. PETER M. (1968)
Antibiotikaresistenz von Staphylokokken boviner Herkunft
aus landwirtschaftlichen Betrieben mit intensiver tier-
ärztlicher Euterüberwachung
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 81, 153 - 155
66. REHDER H. (1960)
Die Antibiotikaresistenz euterpathogener Staphylokokken
Tierärztl. Umsch., 15, 120 - 122
67. REWO M.W., M.D. SHUKOWA (1963)
Veterinärmedizinische Mikrobiologie
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 209 - 212
68. ROLLE M., A. MAYR (1984)
Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 5. Auflage
69. ROSSOW N., J.A. SCHULZ (1975)
Lehrbuch der Rinderkrankheiten
S. Hirzel Verlag, Leipzig, Band II, 176 ff, 449 ff

70. SCHALM O.W. (1985)
A Syllabus on the Mammary Glands in Health and Disease
71. SCHALM O.W., E.J. CAROLL, N.C. JAIN (1971)
Bovine Mastitis
Lea und Febiger Verlag, Philadelphia, 158 ff
72. SCHLEIFER K.H., U. FISCHER (1982)
Description of a New Species of the Genus *Staphylococcus*:
Sta. carnosus
Internat. J. of Syst. Bact., 32, No. 2, 153 - 156
73. SCHLEIFER K.H., R. KILPPER-BÄLZ, L.A. DEVRIESE (1984)
Sta. arlettae sp. nov., *Sta. equorum* sp. nov. and *Sta.*
kloosii sp. nov.: Three New Coagulase-Negative, Novo-
biocin-Resistant Species from Animals
System. Appl. Microbiology, 5, 501 - 509
74. SCHLUEP J. (1979)
In vitro and in vivo activity of cefacetrile against
bovine mastitis organisms
Abstracts of Proceedings of the 21st World Veterinary
Congress, Moscow, Vol. 5,. Section X, 115 - 116

75. SCHLUEP J., A. ROSSELET, H. HEIM (1979)
Comparative Evaluation of Cephacetrile in Experimentally
Induced Bovine Mastitis
Zbl. Vet. Med. B, 26, 304 -324
76. SCHLÜEP J., H. HEIM (1980)
Ausscheidung in der Milch von Cefacetril und Penicillin G
nach intramammärer Applikation zu verschiedenen Zeit-
punkten
Schweiz. Arch. Tierheilk., 122, 39 - 43
77. SCHÖNBERG F. (1956)
Milchkunde und Milchhygiene
M. und H. Schaper, Hannover, 7. Auflage, 120
78. SCHÖNHERR W. (1965)
Tierärztliche Milchuntersuchung
S. Hirzel Verlag, Leipzig, 206 ff
79. SCHUNACK W., K. MAYER, M. HAAKE (1981)
Arzneistoffe - Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie
Friedr. Vieweg und Sohn, Braunschweig, Wiesbaden
474 - 478, 457 - 468

80. SCHWABACHER, CUNCLIFF und WILLIAMS (1945)
Zitat nach Elek S. D. (1959)
Staphylococcus Pyogenes
E. und S. Livingstone LTD., 272
81. TERPLAN G., K. J. ZAADHOF (1969)
Zur diagnostischen und lebensmittelhygienischen Bedeutung
von Staphylococcus aureus in Kuhmilch
Dt. Tierärztl. Wschr., 76, 217 - 221
82. TERPLAN G., K. J. ZAADHOF (1981)
Seminar in der Milchwissenschaft mit Übungen
Teil II, Stand WS 81/82
Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der
Tierärztlichen Fakultät der Universität München
83. VETIMAST^R GEBRAUCHS- UND PRODUKTINFORMATION (Juni 1983)
Ciba Geigy
84. WALTER A. M., L. HEILMEYER (1975)
Antibiotikafibel
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 4. Auflage, 471ff
85. WEIGT U., R. KRAMER (1967)
Zunahme der Antibiotikaresistenz bei Mastitiserregern
Dt. Tierärztl. Wschr., 75, 617 - 622

86. WEIGT U., E. BLECKMANN (1977)
Sensibilitätstest und Mastitistherapie
Dt. Tierärztl. Wschr., 84, 234 - 235
87. ZIV G., F. G. SULMAN (1974)
Absorbition of Antibiotics by the Bovine Udder
J. Dairy Sci., 58, 1637 - 1644
88. ZIV G., J. F. M. NOUWS (1977)
Clinical Pharmacology of Cephacetrile in Ruminants
Zbl. Vet. Med. B, 24, 798 - 811
89. ZIV G. (1980)
Availability and Usage of New Antibacterial Drugs in
Europe
J. Am. Vet. Med. Ass., Vol. 176, 1122 - 1128

Lebenslauf

Am 10. 6. 1959 wurde ich als erstes Kind des Prüffeldingenieurs Martin Treitinger und seiner Frau Waltraud, geb. Hering, (Sekretärin) in München geboren. Mein Bruder Bernd ist 3 Jahre jünger als ich. Meine Einschulung erfolgte in der Volksschule Ottobrunn II. Nach dem 2. Schuljahr mußte ich wegen Platzmangel in die Volksschule München - Waldperlach wechseln. Als ich die 4. Klasse abgeschlossen hatte, trat ich in das mathematisch - naturwissenschaftliche Gymnasium Ottobrunn ein, das ich bis zum Abitur 1979 besuchte. Im Schuljahr 1976 - 77 war ich ein Jahr in den USA und erwarb dort das High - School - Diploma. Seit 1979 studiere ich an der Ludwig - Maximilians - Universität in München Tiermedizin. Die Approbation als Tierärztin erhielt ich am 8. Februar 1985. Seither arbeite ich als Vertretung in der Gemeinschaftspraxis Dr. H. Görblich - Dr. J. Hopf in Wartenberg. Im Januar 1985 begann ich mit den Untersuchungen zu der vorliegenden Dissertation.

Mein Dank gebührt

- Prof. Dr. K. Walser für die Überlassung des
Themas und die fachliche und geduldige Unter-
stützung,
- Prof. Dr. W. Gedek, der den Fachbereich Lebens-
mittelhygiene des Eutergesundheitsdienstes
Bayern leitet, für die Übereignung von Sta-
phylococcus aureus - Stämmen und das Erteilen
hilfreicher Ratschläge,
- den med.-techn. Assistentinnen Frau Altmann -
Kriger und Frau Gebhart für Hinweise labor-
technischer Art,
- und allen anderen, die diese Arbeit erst er-
möglich haben.

